

Aus dem Institut/der Klinik für Augenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Experimentelle Untersuchungen zur Pharmakokinetik lokal  
applizierten Thalidomids am Auge

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Martina Müller  
aus Frankenthal Rheinland Pfalz

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter 1: Prof. Dr. med. U. Pleyer

Gutachter 2: Prof. Dr. med. F. Hoffmann

Gutachter 3: Prof. Dr. med. W. Behrens-Baumann

Datum der Promotion: 28. Januar 2005

## DANKSAGUNG

Ich danke meinen Eltern, Prof. Dr. Uwe Pleyer, Dr. Franz Orou, Dr. Michael Schröter, Thomas Bracher, Esther Meyer und Dr. Olaf Meyer und all meinen Freunden

## **Experimentelle Untersuchungen zur Pharmakokinetik lokal applizierten Thalidomids am Auge**

In den letzten Jahren erfuhr Thalidomid auf Grund seiner antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und antiangiogenetischen Eigenschaften eine „Renaissance“. Bei ophthalmologischen Erkrankungen, die durch Gefäßproliferation gekennzeichnet sind, wie bei der diabetischen Retinopathie und der altersbedingten Makuladegeneration (33) oder bei immunpathologische Erkrankungen wie die Uveitis (44) liegen Berichte zu günstigen Effekten vor. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen bei der systemischen Verabreichung wurde der Versuch einer topischen Applikation angestrebt. Dieser Applikationsweg ist limitiert durch die schlechte Wasserlöslichkeit und hydrolytische Instabilität bei der Formulierung von wässrigen Augentropfen. Zur Erhöhung der intraokularen Bioverfügbarkeit von Thalidomid wurden Cyclodextrine, speziell HP- $\beta$ -CD, als Vehikel zur Verbesserung der physiko-chemischen Eigenschaften verwendet. Die experimentelle Arbeit wurde an 21 pigmentierten Kaninchen durchgeführt, die mit Thalidomid-HP- $\beta$ -CD haltigen Augentropfen oder mit einer Thalidomidsuspension behandelt wurden. Nach einer Einwirkungszeit von 30, 60, oder 240 Minuten wurden die Augen enukleiert, präpariert und eingefroren. Anschließend wurde mittels HPLC die jeweilige Thalidomid-Konzentration ermittelt. Unsere Arbeit hat signifikante ( $p < 0,05$ ) Konzentrationsunterschiede im Kammerwasser zugunsten der HP- $\beta$ -CD Formulierung und im Iris-Ziliarkörper zugunsten der Suspension gezeigt. Unsere Studie hat gezeigt, daß 12,5% HP- $\beta$ -CD sich zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Thalidomid eignet

Schlüsselwörter: Cyclodextrine, Thalidomid, Bioverfügbarkeit, Augenmedikamente, Pharmakokinetik

## **Bioavailability of lokal applied Thalidomide in Ophthalmology**

Background: Thalidomide, which has been rediscovered as an angiogenic, immunomodulatory and anti-inflammatory agent might be a treatment option for several eye diseases. The systemic application causes severe side effects. The water-insolubility and hydrolytic instability of thalidomide limits its ocular bioavailability during local application. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) is a cyclodextrin derivative, which has the ability to form inclusion complexes with lipophilic drugs increasing their stability and solubility. Methods: 21 pigmented male rabbits were treated with 5x50  $\mu$ l 0,04 % thalidomide/12,5% HP- $\beta$ -CD (THA-CD) or 0,04 % thalidomide suspension (THA-SP). 30, 60 or 240 minutes post instillation the animals were sacrificed and the eyes were enucleated. The thalidomide concentrations were determined using HPLC. Results: A significant ( $p < 0,05$ ) difference between the two formulations was found only in the aqueous humor and the iris-ciliary body. Conclusion: The addition of HP- $\beta$ -CD to aqueous eye drops seems to increase the solubility and bioavailability of local applied thalidomide.

Keywords: Cyclodextrins, Thalidomide, Bioavailability, Ophthalmic drugs, Pharmacokinetics

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN.....</b>	<b>3</b>
2.1	ANATOMIE DES AUGES .....	3
2.1.1	Tränenorgan .....	3
2.1.2	Kornea .....	6
2.1.3	Konjunktiva .....	7
2.1.4	Kammerwasser .....	7
2.1.5	Iris .....	7
2.1.6	Ziliarkörper .....	8
2.1.7	Sklera .....	8
2.2	CYCLODEXTRINE .....	9
2.2.1	Struktur und Eigenschaften: .....	9
2.2.2	Löslichkeitsverbesserung .....	10
2.2.3	Irritation und Toxizität .....	10
2.2.4	Dissoziation.....	11
2.2.5	Anwendung .....	11
2.3	THALIDOMID .....	14
2.3.1	Struktur .....	14
2.3.2	Physikalische und chemische Eigenschaften.....	14
2.3.3	Wirkung.....	17
2.3.3	Unverträglichkeit und Toxizität.....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
3.1	VERSUCHSTIERE .....	21
3.2	ENTNOMMENE GEWEBE UND FLÜSSIGKEITEN.....	21
3.3	MATERIALIEN, CHEMIKALIEN, MEDIKAMENTE.....	21
3.4	GERÄTE .....	22
3.5	HERSTELLUNG DER AUGENTROPFEN .....	23
3.6	BEHANDLUNG DER VERSUCHSTIERE .....	24
3.7	EINFRIEREN UND AUFTAUEN DER MATERIALIEN.....	24
3.8	HPLC- GEHALTSBESTIMMUNG VON THALIDOMID.....	25
3.9	GEWEBEAUFARBEITUNG .....	25
3.9.1	Kornea .....	25
3.9.2	Konjunktiva .....	26
3.9.3	Iris-Ziliarkörper.....	26
3.9.4	Glaskörper .....	26
3.9.5	Sklera .....	26
3.9.6	Plasma .....	26
3.10	STATISTIK .....	27
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
4.1	BIOVERFÜGBARKEIT DES THALIDOMIDS NACH ½-, 1- UND 4- STÜNDIGEM APPLIKATIONSINTERVALL .....	28
4.1.1	Kammerwasser .....	28
4.1.2	Glaskörper .....	29
4.1.3	Kornea .....	30
4.1.4	Konjunktiva .....	31
4.1.5	Sklera.....	32
4.1.6	Iris-Ziliarkörper.....	33
4.1.7	Plasma .....	34
4.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	35
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>46</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Auges (aus 55).....	3
Abbildung 2: Tränendrüse und Abflußwege der Tränenflüssigkeit (aus 135).....	4
Abbildung 3: Aufbau des menschlichen Tränenfilms (aus 137).....	5
Abbildung 4: Aufbau der Kornea (modifiziert nach 8) .....	6
Abbildung 5: Chemische Struktur von $\alpha$ -, $\beta$ -, und $\gamma$ -Cyclodextrinen (aus 55) .....	9
Abbildung 6: Thalidomidstruktur.....	14
Abbildung 7: Spontane Hydrolyse des Thalidomids (aus 78) .....	16
Abbildung 8: Mögliche Wirkungsmechanismen des Thalidomids (100).....	17
Abbildung 9: Thalidomidspiegel im Kammerwasser des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP) * Signifikant ( $p < 0,05$ ) .....	29
Abbildung 10: Thalidomidspiegel im Glaskörper des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP).....	30
Abbildung 11: Thalidomidspiegel in der Kornea des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP).....	31
Abbildung 12: Thalidomidspiegel in der Konjunktiva des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP) .....	32
Abbildung 13: Thalidomidspiegel im Iris-Ziliarkörper des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP), *Signifikant ( $p < 0,05$ ).....	34
Abbildung 14: Thalidomidspiegel im Kammerwasser und Glaskörper des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP), *Signifikant ( $P < 0,05$ ), SD= Standardabweichung (121) .....	36
Abbildung 15: Thalidomidspiegel in den Augengeweben des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP), Signifikant ( $P \geq 0,05$ ) (121) .....	37
Abbildung 16: Flußdiagramm zur Beschreibung der okularen Aufnahme eines präkorneal applizierten Wirkstoffs; korneale und konjunktival-sklerale Route nach Schoenwald (110) .....	40
Abbildung 17: Okulare Aufnahme eines präkorneal applizierten Wirkstoffs; korneale und konjunktival-sklerale Route modifiziert nach Schoenwald (110).....	40
Abbildung 18: Schema der Blutgefäße des Auges (aus 54) .....	42

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Struktur der häufig verwendeten Cyclodextrine (141) .....	10
Tabelle 2: Topische Applikation von Augenmedikamenten im Zusammenhang mit Cyclodextrinen (modifiziert nach 84) .....	12
Tabelle 3: Versuchstiere .....	24
Tabelle 4: HPLC – Gehaltsbestimmung (THA) (modifiziert nach 30).....	25
Tabelle 5: THA-Wiederfindungsraten bei okularen Geweben des Rinderauges bzw. Rattenplasma (120): .....	27
Tabelle 6: Physikalisch-chemische Parameter der Thalidomid-Augentropfen .....	28
Tabelle 7: Thalidomid-Verteilung im Kammerwasser .....	28
Tabelle 8: Thalidomid-Verteilung im Glaskörper .....	29
Tabelle 9: Thalidomid-Verteilung in der Kornea .....	30
Tabelle 10: Thalidomid-Verteilung in der Konjunktiva .....	31
Tabelle 11: Thalidomid-Verteilung in der Sklera.....	32
Tabelle 12: Thalidomid-Verteilung im Iris-Ziliarkörper .....	33
Tabelle 13: Thalidomid-Verteilung im Plasma .....	34
Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse .....	35

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$ -CD	Alpha-Cyclodextrin
AER	apical ectodermal ridge
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
$\beta$ -CD	Beta-Cyclodextrin
bFGF	beta-fibroblastischer Wachstumsfaktor
C <sub>max</sub>	Maximalkonzentration
CT	Gewebekonzentration
CD	Cyclodextrin
DLE	diskoid Lupus erythematodes
DM- $\beta$ -CD	Dimethyl-beta-Cyclodextrin
ENL	Erythema nodosum leprosum
FDA	Food and Drug Administration (amerikanische Arzneimittelbehörde)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblastärer Wachstumsfaktor)
HP- $\beta$ -CD	Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin
HPLC	High performance liquid chromatography
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IOP	Intraocular pressure (Intraokularer Druck)
LD	letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
MDP	Magen-Darm-Passage
PBMC	Monozyten im peripheren Blut
PDE4	Phosphodiesterase-4-Inhibitoren
PPD	Proteinderivate
n	Anzahl der Stichproben
S.E.M.	Standard error of the mean (Standardabweichung)
SBE- $\beta$ -CD	Sulfobutyläther-beta-Cyclodextrin
TB	Tuberkulose
T-Helfer-Typ1	(IL-2, INF- $\gamma$ ) zelluläre Immunität
T-Helfer-Typ2	(IL-4, IL-10) humorale Immunität
t <sub>max</sub>	Zeit der maximalen Konzentration
THA	Thalidomid
THA-CD	Thalidomid-Cyclodextrin
THA-SP	Thalidomid-Suspension
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
VCAM-1	Vascular-cell-adhesion-molecule 1

## 1 EINLEITUNG

In der Medizin hat die Entwicklung neuer Medikamente einen hohen Stellenwert. Daneben kann aber auch die Modifizierung bereits bekannter Wirkstoffe sowie die Verwendung von Trägersubstanzen therapeutisch von Nutzen sein.

Thalidomid zeigt Therapieerfolge bei immunpathologischen Krankheiten wie die Lepra lepromatosa, therapierefraktäre Dermatosen (41,66,117-118), Aphten bei Behçet-Krankheit (23,27,38,48-49,126,150-152,155), Ulzera bei AIDS-Patienten (3,57-59,105,154), HIV wasting (42-43,76-77,85,103,115), und multiplem Myelom (Morbus Kahler) (5,21,47,81,100,104,117,125,140). Es wirkt antiinflammatorisch, immunmodulatorisch und antiangiogenetisch. Der genaue Wirkungsmechanismus ist allerdings bis heute noch nicht geklärt. Seine antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Eigenschaften beruhen aber wahrscheinlich auf der inhibitorischen Wirkung auf von T-Lymphozyten gebildete Zytokine. Zusätzlich war eine von vielen Theorien der teratogenen Wirkung des Thalidomids die Inhibition der Angiogenese.

Diese Eigenschaften sind in der Augenheilkunde sehr erwünscht. Weltweit ist die okuläre Gefäßproliferation eine der Hauptursachen, die zur Erblindung führt. Zur Zeit wird die retinale Gefäßneubildung mit Laserkoagulation behandelt, die aber ihrerseits zum Untergang von Retinagewebe führt. Eine weitere ophthalmologische Erkrankung, die erhebliche therapeutische Probleme bereitet, und wofür Thalidomid ein Therapeutikum darstellen könnte, ist die Uveitis. Die Therapie dieser intraokularen Entzündung (Uveitis) richtet sich nach der Ursache (Rheumatischer Formenkreis, Toxoplasmose usw.), Art der Uveitis (vordere, mittlere, hintere) und der Zahl der abgelaufenen Schübe. Zum Einsatz kommen u.a. lokal applizierte Kortikosteroide (Augentropfen, Augensalben, subkonjunktivale/parabulbäre Injektionen), die systemische Kortikosteroidtherapie, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Methotrexat, Cyclosporin A, Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil, Etanercept sowie auch Antibiotika. Diese Medikamente führen zum Teil zu erheblichen Nebenwirkungen: Kortikosteroide (Glaukom, Katarakt und Schädigung des Nervus opticus), NSAR (Magen-Darm-Ulzera, Nierenfunktionsstörungen), Methotrexat (Magen-Darm-Ulzera, Exanthem, Haarausfall, Störung der Hämatopoese, Lungenfibrose), Cyclosporin A (Hypertrichosis, Gingivitis hyperplastica, Nierenfunktionsstörungen, Hypertonus, Mißempfindungen und eine erhöhte Rate an Malignomen), Azathioprin (Magen-Darm-Beschwerden, Panzytopenie, Pankreatitis, Alopezie), Mycophenolat-Mofetil (Magen-Darm-Beschwerden, Leukozytopenie, Thrombozytopenie), Etanercept (lokale Irritation an der Einstichstelle, Infektion der oberen Atemwege, Bildung von Anti-ds-DNA-Antikörper).

Die Behandlung von Augenerkrankungen umfaßt ein weites Spektrum therapeutischer Möglichkeiten, lokale so wie auch systemische Applikationsarten kommen zum Einsatz. Die systemische Applikation, intravenös oder parenteral, hat den Nachteil, dass die Medikamente systemische Wirkungen und Nebenwirkungen entfalten. Diese werden noch verstärkt, weil zur Überwindung der Diffusionsbarrieren im Auge (Blut-Netzhaut- und Blut-Kammerwasser-Schranke) unverhältnismäßig hohe Serumwirkstoffspiegel nötig sind. Ziel der medikamentösen Therapie von Augenerkrankungen ist eine hohe Bioverfügbarkeit am Wirkort bei möglichst geringen systemischen Nebenwirkungen. Aus diesen Gründen ist die lokale Therapie der systemischen vorzuziehen. Die lokalen Applikationsarten umfassen die topische Anwendung sowie die subkonjunktivale oder retrobulbäre Injektion. Die am häufigsten angewendete lokale Anwendung in der Augenheilkunde ist die topische Applikation von Augentropfen. Eine pharmakokinetische Herausforderung stellt dabei die Penetration der Kornea dar, die die Hauptbarriere des Auges darstellt.

Die schlechte Löslichkeit, rasche hydrolytische Degeneration und geringe Korneapenetration des Thalidomids sind limitierende Faktoren zur Erreichung eines effektiven Wirkspiegels im Auge. Am Auge bietet das Epithel der Kornea die größte Penetrationsbarriere für hydrophile und geladene Teilchen (1,24,148). Die Menge der Substanz, die diese Barriere überwindet, scheint linear von der Konzentration und der Dauer der Einwirkungszeit abzuhängen (24).

Von pharmakologischer Seite werden Bemühungen unternommen, die okuläre Bioverfügbarkeit durch Wirkstoffkonzentrationserhöhung, der Verlängerung der Verweildauer sowie der Unterbrechung der kornealen Epithelbarriere (z.B. durch Konservierungsstoffe) zu verbessern. Eine weitere Möglichkeit bieten Cyclodextrine, die die Bioverfügbarkeit durch Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs erhöhen.

Cyclodextrine werden in der Produktion von Augentropfen aufgrund ihrer löslichkeitsverbessernden



Eigenschaften und dem Schutz vor hydrolytischer Degeneration verwendet (78). Ihre Struktur gibt ihnen die Möglichkeit, Einschlusskomplexe mit apolaren Substanzen zu bilden und dadurch die Pharmakokinetik der eingeschlossenen Substanz zu verbessern.

**Ziel unserer Untersuchungen war daher zu prüfen, inwieweit sich die okulare Pharmakokinetik von lokal appliziertem Thalidomid durch den Zusatz von Cyclodextrinen verbessern läßt.**

Unsere in-vivo-Studie am Kaninchenauge soll feststellen, ob der Zusatz von Cyclodextrinen einen positiven Einfluß auf die okulare Verfügbarkeit von Thalidomid hat. Hierfür wurde in den einzelnen okularen Geweben die Thalidomid-Konzentration nach Applikation von THA-SP- oder THA-CD-haltigen Augentropfen bestimmt und miteinander verglichen. Im einzelnen war zu klären:

1. Besteht eine Verbesserung der Löslichkeit des Thalidomids durch den Zusatz von Cyclodextrinen und damit eine erhöhte intraokulare Verfügbarkeit?
2. Wie verteilt sich das Thalidomid im Kaninchenauge nach Applikation einer cyclodextrinhaltigen Lösung im Vergleich zur Suspension?
3. Eignet sich Thalidomid zur Herstellung wässriger Augentropfen?

## 2 GRUNDLAGEN

### 2.1 Anatomie des Auges

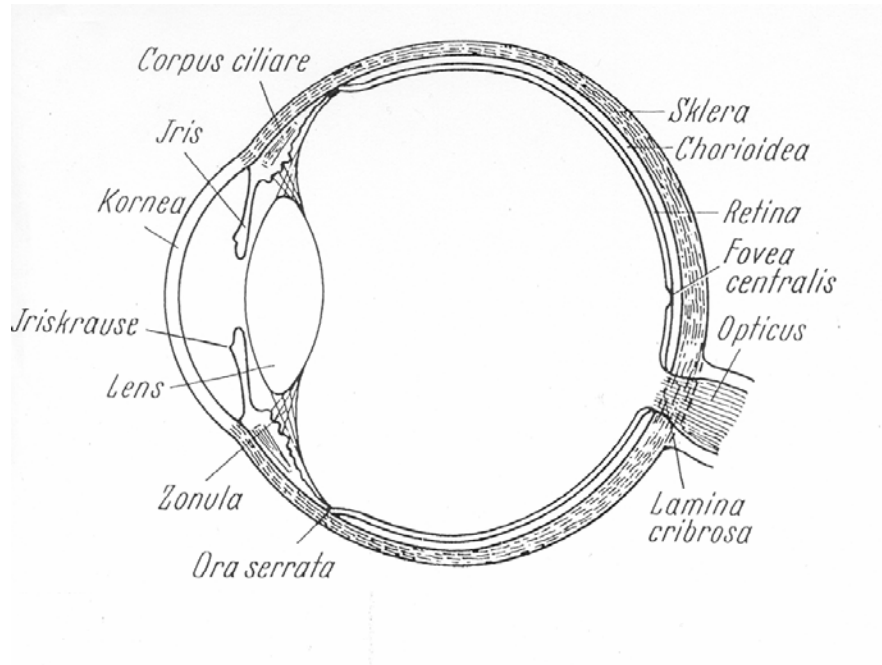


Abbildung 1: Aufbau des Auges (aus 55)

Die Behandlung von Augenerkrankungen ist eine besondere Herausforderung. Die medikamentöse Therapie kann sowohl auf lokalem als auch auf systemischem Weg erfolgen. Beide Applikationsformen finden in der Augenheilkunde Verwendung. Ziel beider Therapiearten ist es einen hohen Wirkstoffspiegel im Inneren des Auges zu erreichen. Beide Applikationswege haben ihre Vor- und Nachteile.

#### Die systemische Applikation von Medikamenten birgt zwei Nachteile:

1. Zum Erreichen eines ausreichend hohen Konzentrationsspiegels im Auge müssen sehr hohe Medikamentendosen verabreicht werden. Ursächlich hierfür ist der große Verdünnungseffekt durch die Verteilung im Gesamtkreislauf sowie die Blut-Netzhaut- und Blut-Kammerwasser-Schranken, die als Diffusionsbarrieren fungieren.
2. Die systemische Applikation birgt auch systemische Wirkungen bzw. Nebenwirkungen.

Auf der anderen Seite gibt es die lokale Therapie, die aufgrund einer höheren Effizienz und geringeren Nebenwirkungsrate die meistverwendete Applikationsart in der Augenheilkunde darstellt. Dafür, daß ein Medikament in Form von Augentropfen/Augensalben ins Innere des Auges gelangt, sind die Strukturen, die als Penetrationsbarrieren dienen, sowie das Tränenabflußsystem des Auges von entscheidender Bedeutung.

#### 2.1.1 Tränenorgan

Das Tränenorgan besteht aus der Tränendrüse und den ableitenden Tränenwegen.

### 2.1.1.1 Tränendrüse

Die Tränendrüse ist eine exokrine Drüse und liegt dicht unter dem schläfenwärtigen oberen Orbitalrand. Ihre Aktivität basiert auf einer sehr komplexen neuro-anatomischen Stimulation, die sowohl reflektorischer als auch psychogener Natur ist. Hinzu kommen multiple kleine akzessorische Tränendrüsen (Kraus und Wolfring) die in den Augenlidern lokalisiert sind und unter sympathischer Stimulation für die basale Tränensekretion verantwortlich sind.

### 2.1.1.2 Ableitende Tränenwege

Die ableitenden Tränenwege bestehen aus oberem und unterem Tränenröhrchen, dem Tränensack und dem Tränennasenkanal. Der Tränenabfluß beginnt mit den Tränenpunktkörpern, 0,3 mm großen Öffnungen am medialen Ober- und Unterlidrand, welche sich synchron mit jedem Lidschlag öffnen und schließen. Der Abfluß der Tränenflüssigkeit basiert auf einem Unterdruck im Tränensack, dem „Krehbiel flow“ (87), der durch den Sog der Atemluft erzeugt wird. Dieser Unterdruck sorgt für den Abtransport der Tränenflüssigkeit über Tränenröhrchen, Tränensack und Tränennasenkanal bis zur unteren Nasenmuschel.

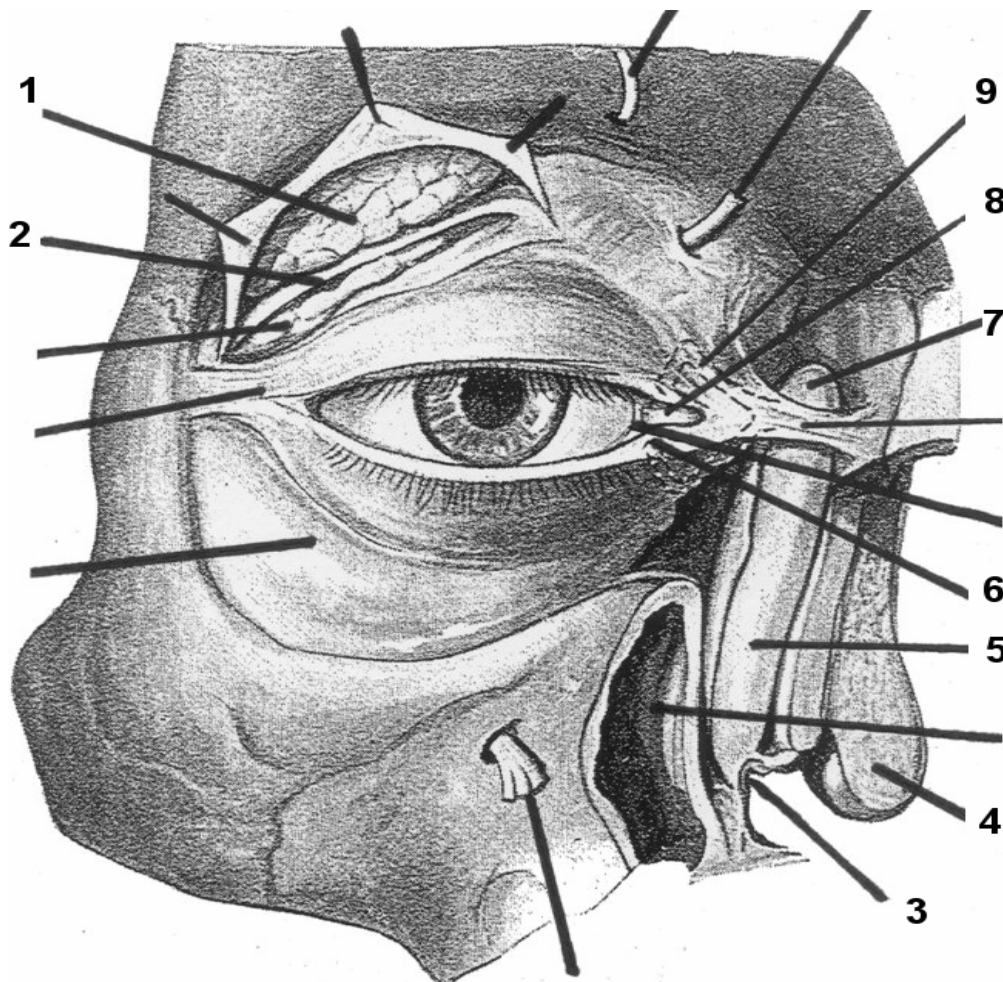


Abbildung 2: Tränendrüse und Abflußwege der Tränenflüssigkeit (aus 135)

1 Glandula lacrimalis superior (Pars orbitalis), 2 Glandula lacrimalis interior (Pars palpebralis)  
 3 Mündung des Ductus nasolacrimalis, 4 Concha nasalis inferior, 5 Ductus nasolacrimalis, 6 Papilla lacrimalis mit Punctum lacrimale, 7 Saccus lacrimalis, 8 Caruncula lacrimalis, 9 Canaliculus lacrimalis superior

### 2.1.1.3 Tränensekretion

Die Kinetik der Tränensekretion ist ein wichtiger Faktor bei der Lokal-Therapie von Augenerkrankungen. Die Kinetik variiert erheblich zwischen verschiedenen Species und repräsentiert den größten Unterschied in der Pharmakokinetik in Medikamentenpenetrationsstudien zwischen dem Menschen und dem Kaninchen, dem meist verwendeten Tiermodell. Die Tränensekretion beläuft sich durchschnittlich auf 1,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  unter normalen physiologischen Bedingungen, kann aber durch Reizung auf das Hundertfache gesteigert werden (88). Auf der anderen Seite ist die Tränensekretion während der Anästhesie vermindert (70), und es wird vermutet, daß die Tränensekretion ebenfalls während der Schlafphase durch fehlende Stimulation herabgesetzt ist (88). Das durchschnittliche Bindehautsackvolumen beträgt 7-10  $\mu\text{l}$  (88,119) und kann bis auf das maximale Fassungsvermögen von 20-30  $\mu\text{l}$  gesteigert werden, ohne daß Tränenflüssigkeit über den Lidrand verloren geht (88,119). Die Aktion der Lider sorgt dafür, daß pro Lidschlag 2  $\mu\text{l}$  des Tränenvolumens aus dem Auge entfernt wird (88). Die durchschnittliche Austauschrate des Tränenfilms beläuft sich auf ca. 10-15% pro Minute (119).

### 2.1.1.4 Tränenfilm

Der Tränenfilm besteht aus drei Schichten, die von unterschiedlichen Drüsen gebildet werden und unterschiedlicher Funktion sind. Es gibt eine oberflächliche Fettschicht, die durch die Meibomschen und Zeisschen Drüsen produziert wird. Diese Fettschicht verleiht der Tränenflüssigkeit ihre Haftfähigkeit. Die mittlere, wässrige Schicht besteht aus Wasser, Elektrolyten und Proteinen und wird durch die Tränendrüse produziert. Die innere Schleimschicht wird von den akzessorischen Tränendrüsen produziert.

Der durchschnittliche präkorneale Tränenfilm ist ungefähr 7-9  $\mu\text{m}$  dick (4,26,91) und hat ein Volumen von 7,4  $\mu\text{l}$  (4). Die präkorneal maximal aufnehmbare Flüssigkeitsmenge beträgt ca. 30  $\mu\text{l}$  (74), und limitiert dadurch das applizierbare Tropfvolumen. Der Tränenfilm hat einen pH-Wert von 6,5-7,6 mit einer Evaporationsrate von 0,06  $\mu\text{l}/\text{cm}^2/\text{min}$  und eine Osmolarität von 296-308 mOsm (4). Applizierte Augenmedikamente mit einem pH-Wert zwischen pH 6 und pH 9 werden gut vertragen, pH-Werte darüber oder darunter führen zu Irritationen und einem verstärkten Tränenfluß (74). Der Tränenfilm bietet dem Auge eine optisch glatte Oberfläche am Luft-Auge-Übergang, entfernt Verschmutzungen und führt dem Korneaepithel Sauerstoff zu. Zusätzlich bietet der Tränenfilm der Kornea einen Schutz vor Austrocknung, einen Gleitschutz an der Kornea-Lid-Grenzfläche sowie auch eine bakterizide Wirkung.

In Bezug auf eine medikamentöse Therapie hat der Tränenfilm eine entscheidende Rolle. Aus pharmakologischer Sicht kann die Penetration eines Medikamentes durch die Kornea einfach durch eine Wirkstoffkonzentrationserhöhung im Tränenfilm verbessert werden. Dieser Prozess ist allerdings limitiert wenn die Löslichkeit der eingesetzten Substanz gering ist, wie bei lipophilen Substanzen z.B. Steroiden (86) und Thalidomid. Durch den Proteingehalt der Tränenflüssigkeit (Albumin, Lysozym, u.a.), besteht die Möglichkeit einer präkornealen Proteinbindung verschiedener Arzneistoffe (z.B. Pilocarpin), und damit verbunden eine Verringerung der Bioverfügbarkeit.

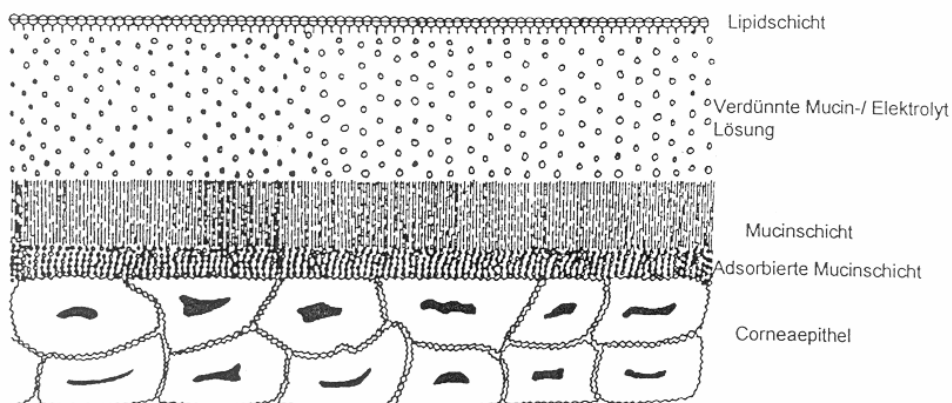
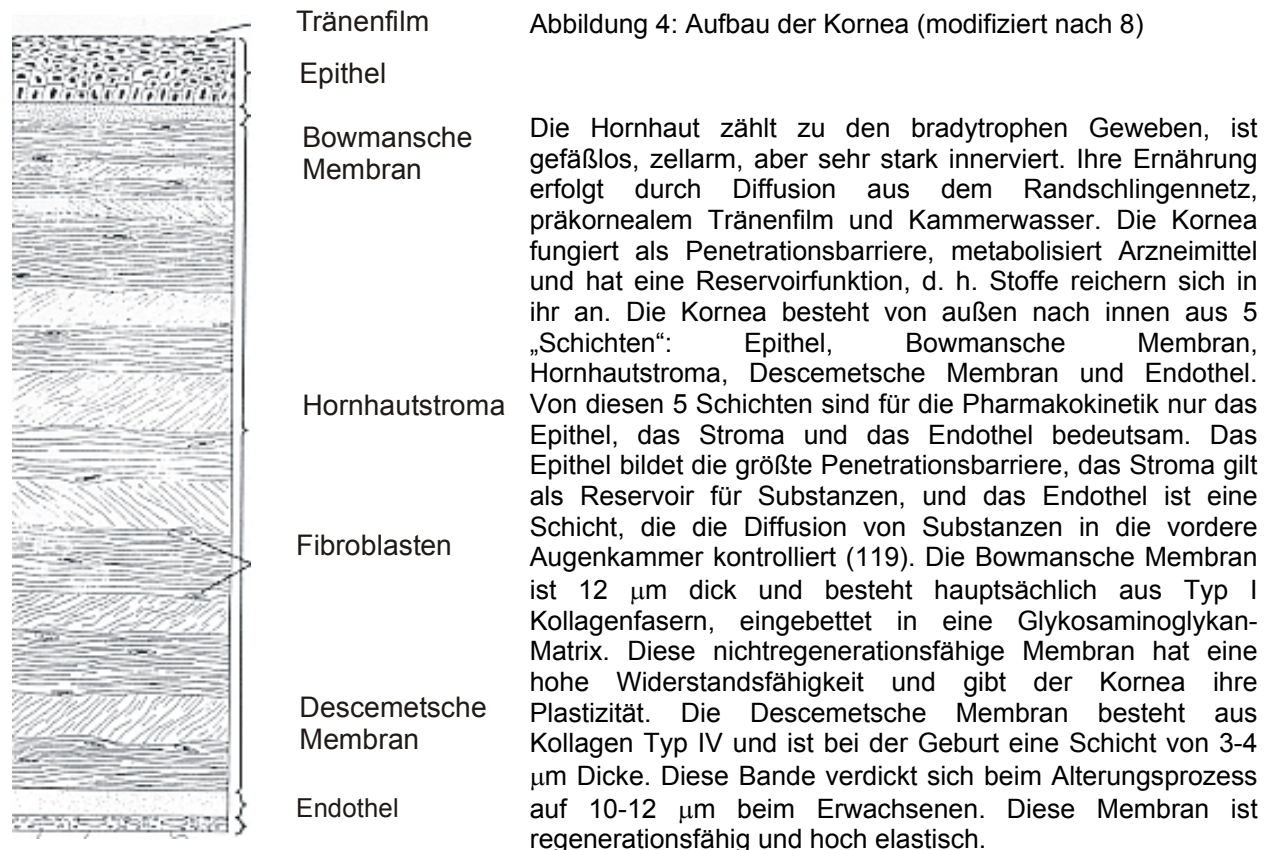


Abbildung 3: Aufbau des menschlichen Tränenfilms (aus 137)

### 2.1.1.5 Lidaktion

Der Lidschlag ist ein entscheidender Faktor für die Durchmischung der Tränenflüssigkeit. Beim Menschen kann man durch die Lidaktion eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszeinkonzentration im präkornealen Tränenfilm beobachten. Diese Konzentrationsabnahme ist wesentlich der Lidfunktion zuzuschreiben und unterbleibt, wenn die Lidaktion ausbleibt. (Eine detaillierte Ausführung über die Unterschiede zwischen dem Kaninchen und dem Menschen bezüglich der Lidaktion erfolgt in der Diskussion).

### 2.1.2 Kornea



#### 2.1.2.1 Epithel

Das Epithel ist eine Lipidmembran, die die Hauptbarrierefunktion der Kornea darstellt. Die äußerste Schicht des Epithels besteht aus squamösen Zellen, die durch tight junctions verbunden sind und eine extrem starke Barriere für lipidunlösliche Substanzen und geladene Teilchen darstellen. Die Menge der Substanz, die diese Barriere überwindet, scheint linear von der Konzentration und der Dauer der Einwirkungszeit abzuhängen. Versuche mit Fluoreszein haben gezeigt, daß trotz intensiver Anfärbung der Tränenflüssigkeit die squamösen Zellen keinerlei Fluoreszenz aufweisen. Das spricht dafür, daß die Penetration der Kornea via Interzellulär-Spalt erfolgt (64). Ein ähnliches Permeabilitätsverhalten weisen positiv und negativ geladene Teilchen auf (71).

Lipophile Substanzen penetrieren die Kornea mit Leichtigkeit, was vermuten läßt, daß diese Substanzen die Zellmembran durchdringen können (13,131).

### 2.1.2.2 Hornhautstroma

Das Hornhautstroma ist ein hydrophiles, zellarmes Gewebe, bestehend aus 80% Wasser sowie ca. 18% Kollagen Typ I. Im Gegensatz zum Epithel penetrieren geladene und hydrophile Teilchen das Stroma sehr gut. Seine lockere Struktur ist dafür verantwortlich, daß Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter 500.000 Dalton das Stroma per Diffusion durchdringen können (88). Durch sein großes Volumen fungiert diese Schicht als Reservoir für Substanzen.

### 2.1.2.3 Endothel

Das Endothel, die innerste Schicht der Kornea, ist wie das Epithel eine Lipidmembran und stellt eine Permeabilitätsbarriere zwischen Kammerwasser und Korneastroma dar. Dem Endothel kommt eine aktive Pumpfunktion zu, dessen Aufgabe es ist, die Stärke des Stromas durch Entfernen von in ihr enthaltener Gewebeflüssigkeit konstant zu halten. Bei der Geburt besteht das Endothel aus einer einzigen, 5 µm dicken Zellschicht aus ungefähr 1 Million hexagonal geformten Zellen. Mit dem Alterungsprozess vermindert sich die Anzahl an Endothelzellen, und die Schicht verdünnt sich.

Die Resistenz des Kaninchenendothels gegenüber kleineren Ionen ist 100 bis 200 mal geringer als die des Kaninchenepithels (88). Das Penetrationsverhalten des Endothels scheint vom Molekulargewicht der Substanz abzuhängen. Die Permeabilitätsrate vermindert sich mit steigendem Molekulargewicht. Das Molekulargewicht scheint nicht der alleinige Faktor für das Penetrationsverhalten von verschiedenen Substanzen zu sein, denn einige Medikamente zeigen ein besseres Penetrationsverhalten als ihr höheres Molekulargewicht vermuten läßt. Ein Beispiel hierfür ist Pilocarpin, für welches das Endothel keine Barrierefunktion darstellt, denn wir finden identische Konzentrationen im Stroma wie im Kammerwasser (122).

### 2.1.3 Konjunktiva

Die Konjunktiva ist ca. 2- bis 30-fach mehr für Pharmaka durchlässig als die Kornea, vermutlich durch die größere Absorptionsfläche, schwächer ausgebildeten „tight junctions“, und den größeren Intrazellulärspalten (74). Es wurde postuliert (55,135), daß das Ausmaß der Penetration einer in der Tränenflüssigkeit vorhandenen Substanz durch die Konjunktiva und Sklera im Vergleich zur Kornea sehr gering ist. Ursächlich hierfür schienen die limbusnahen Gefäße zu sein, die einen Großteil dieser Substanz abfangen, bevor diese die vordere Augenkammer erreicht (88). Neuere Studien haben jedoch gezeigt, daß ein konjunktivaler Aufnahmeweg sehr wohl existiert und das Carbonanhydraseinhibitoren-Analoga, Methazolamide und 6 Carboxyfluorescein über den konjunktivalen Aufnahmeweg hohe Wirkstoffkonzentrationen im Iris-Ziliarkörper erreicht werden (74). Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Medikamente durch eine vaskuläre Aufnahme (vermutlich A. ziliaris anterior) in der Sklera den Ziliarkörper erreichen (74).

### 2.1.4 Kammerwasser

Das Kammerwasser wird durch den Ziliarkörper in der hinteren Augenkammer gebildet und gelangt zwischen Linse und Iris in die vordere Augenkammer (56). Das Kammerwasser wird durch den Schlemmschen Kanal drainiert.

### 2.1.5 Iris

Die Iris ist der vorderste Abschnitt der Uvea und ist mit dem vorderen Teil des Ziliarkörpers verbunden. Die Iris besteht aus einer kollagenhaltigen Bindegewebsschicht und zwei Epithelschichten. Das Bindegewebe der Iris ist sehr locker und für den freien Austausch zwischen der Vorderkammer und der Iris verantwortlich. Viele Studien haben darauf hingewiesen, daß dieser Faktor dafür verantwortlich ist, daß die Medikamentenkonzentration in der Iris zu jeder Zeit gleich hoch oder höher ist als die Konzentration im Kammerwasser (88).

### 2.1.6 Ziliarkörper

Der Ziliarkörper ist mit einer doppelten Epithelschicht überkleidet. Die äußere, pigmentierte Schicht ist mit dem retinalen Pigmentepithel und die innere, nicht pigmentierte Schicht ist mit dem retinalen Neuroepithel verbunden. Das Epithel des Ziliarkörpers ist für die Produktion des Kammerwassers verantwortlich. Unter dem Epithel der Pars plicata des Ziliarkörpers ist eine gefäßreiche Bindegewebsschicht. Die absolute Oberfläche dieser Gefäße errechnet sich beim Kaninchen mit 67 cm<sup>2</sup> (10), der Blutfluß beläuft sich auf 20 ml/g Gewebe/Stunde (88). Dieses ausgeprägte Gefäßsystem ist für die systemische Wirkung von Augenmedikamenten wichtig.

### 2.1.7 Sklera

Die Sklera bildet gemeinsam mit der Kornea und der Konjunktiva die äußerste Hülle des Auges. Sie ist aus straffem kollagenfaserigem Bindegewebe aufgebaut, und hat für die Formkonstanz des Augapfels eine große Bedeutung. Sie reicht von der Eintrittsstelle des Sehnervs bis zum Limbus corneae. Die Sklera ist bis auf Gefäße in der Nähe der Kornea, am Sehnerveneintritt und im Bereich der Muskelansätze kam durchblutet, wird aber von zahlreichen Ziliargefäßen durchbohrt. Die Sklera hat eine 17-fach größere Oberfläche als die 1 cm<sup>2</sup> große Oberfläche der Kornea, und ist ca. 15- bis 25-fach mehr durchlässig (74). Medikamente durchdringen die Sklera und erreichen die intraokularen Gewebe und Flüssigkeiten per diffusionem (74). Medikamente, die per diffusionem über die Sklera aufgenommen werden, sind Steroide, Carboplatin, Methotrexat, sowie auch das 150 kDa große Dextran Molekül (74).

Die Sklera ist anatomisch mit dem hydrophilen Stroma der Kornea vergleichbar, und hydrophile Substanzen können das Stroma sehr gut per diffusionem durchdringen. Wie schon bei der Konjunktiva erwähnt erreichen Medikamente vermutlich durch eine vaskuläre Aufnahme in der Sklera den Ziliarkörper (74).

## 2.2 Cyclodextrine

Die Verwendung von Cyclodextrinen (CD) in der Produktion von Augentropfen gründet sich auf der Löslichkeitsverbesserung apolarer Substanzen und dem Schutz vor hydrolytischer Degeneration (78). Diese Eigenschaften führen zur Verbesserung der intraokularen Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs (130).

### 2.2.1 Struktur und Eigenschaften:

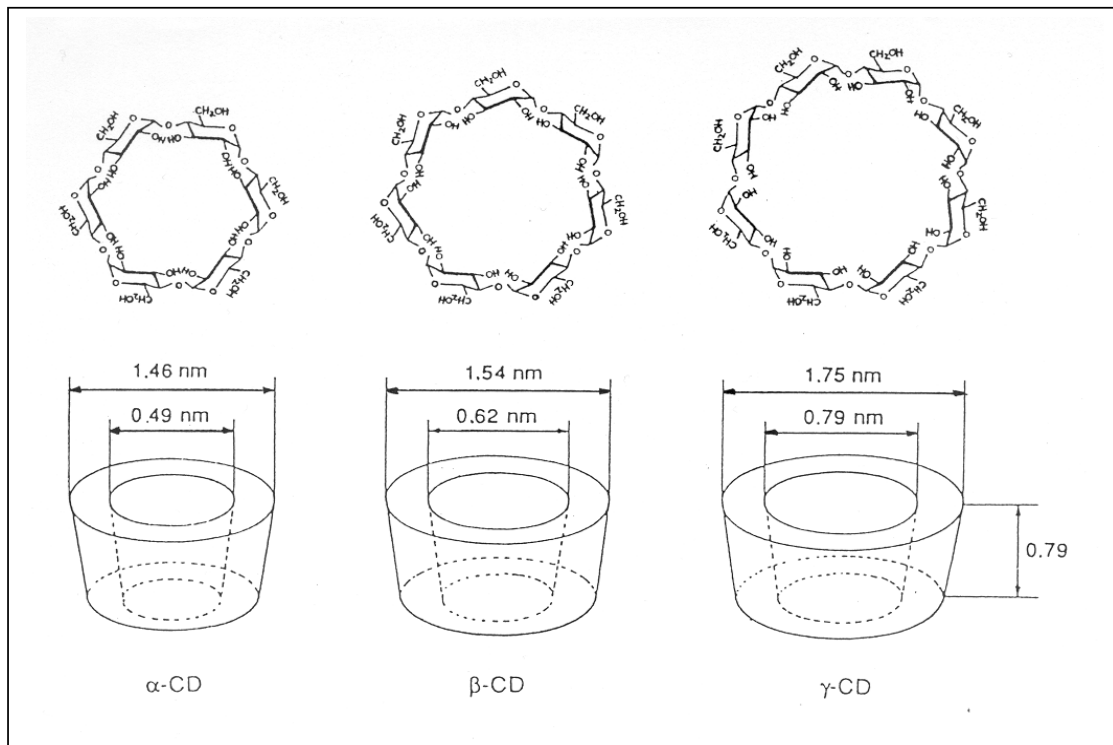


Abbildung 5: Chemische Struktur von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrinen (aus 55)

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide mit 6-8 Glukoseuntereinheiten, die durch  $\alpha(1-4)$ -glykosidische Verbindungen verknüpft sind (78), wobei die Bezeichnung  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - die entsprechende Anzahl der (6,7 oder 8) Glukoseeinheiten angibt. Die Cyclodextrine bilden Glukopyranose-Einheiten, bei denen durch die spezielle Anordnung der Glukoseeinheiten die Außenseite des Moleküls hydrophil und die Innenseite hydrophob ist (73,78). Die hydrophoben Hohlräume geben dem CD-Molekül die Möglichkeit, Einschlußkomplexe mit apolaren Substanzen zu bilden. Diese Art der Komplexbildung führt zu einer Löslichkeits- und Stabilitätsverbesserung sowie auch zu einer Irritations- und Toxizitätsverminderung der eingeschlossenen Substanz (141).

Die Komplexbildung zwischen Substrat und Ligand folgt einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 oder 2:1 (139).



Tabelle 1: Struktur der häufig verwendeten Cyclodextrine (141)

Cyclodextrin	Abkürzung	R	n
$\alpha$ -cyclodextrin	$\alpha$ -CD	H	4
$\beta$ -cyclodextrin	$\beta$ -CD	H	5
$\gamma$ -cyclodextrin	$\gamma$ -CD	H	6
Carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin	CM- $\beta$ -CD	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	5
Carboxymethyl-ethyl- $\beta$ -cyclodextrin	CME- $\beta$ -CD	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> oder H	5
Diethyl- $\beta$ -cyclodextrin	DE- $\beta$ -CD	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> oder H	5
Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin	DM- $\beta$ -CD	CH <sub>3</sub> oder H	5
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	M- $\beta$ -CD	CH <sub>3</sub> oder H	5
Random methyl- $\beta$ -cyclodextrin	RM- $\beta$ -CD	CH <sub>3</sub> oder H	5
Glucosyl- $\beta$ -cyclodextrin	G1- $\beta$ -CD	Glucosyl oder H	5
Maltosyl- $\beta$ -cyclodextrin	G2- $\beta$ -CD	Maltosyl oder H	
Hydroxyethyl- $\beta$ -cyclodextrin	HE- $\beta$ -CD	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH oder H	5
Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin	HP- $\beta$ -CD	CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>3</sub> oder H	5
Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin	SBE- $\beta$ -CD	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> Na oder H	5

## 2.2.2 Löslichkeitsverbesserung

Bei der Löslichkeitsverbesserung verschiedener Medikamente mit Cyclodextrinen sind folgende Punkte zu berücksichtigen:

1. Die löslichkeitssteigernde Wirkung von Cyclodextrinen übersteigt nicht die molare Konzentration des zugesetzten Cyclodextrins (141).
2. Die intrinsische Löslichkeit des Medikamentes ist entscheidend für die maximal erreichbare Löslichkeit durch Zusatz eines Cyclodextrins (141).
3. Die meisten Medikamente bilden mit Cyclodextrinen ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 (Bindungskonstante K<sub>1:1</sub>) (141).
4. Cyclodextrine sind zur Löslichkeitsverbesserung durch das Spektrum an möglichen Bindungskonstanten  $K_{1:1} = 100-20000 \text{ M}^{-1}$  und der maximal verwendeten Cyclodextrinkonzentration von 0,1-0,2 M bei einer 1:1-Interaktion zwischen Medikament und Cyclodextrin auf einen löslichkeitsfördernden Faktor von 1000-2000 limitiert. Daraus ergibt sich ein löslichkeitssteigernder Effekt der Cyclodextrine in der Größenordnung von  $\mu\text{g/ml}$  auf  $\text{mg/ml}$ , aber nicht von  $\text{ng/ml}$  auf  $\text{mg/ml}$  (141).

## 2.2.3 Irritation und Toxizität

Reine CD können auf Grund ihrer hämolytischen und nephrotoxischen Nebenwirkungen nicht zum Einsatz kommen (139,141). Die i.v.-Applikation von  $\beta$ -CD bei Ratten zeigte eine LD<sub>50</sub> von 800 mg/kg (142). Als klinische Zeichen dieser Nebenwirkungen wurde ein erhöhter Serum-Harnstoffspiegel, eine verminderte Nierenenzymaktivität und eine Gewichtserhöhung der Niere beobachtet (142). Die Ätiologie dieser Nebenwirkungen ist unklar, aber es wird vermutet, daß Cyclodextrine Komponenten wie Cholesterin und Phospholipide aus der Lipidmembran extrahieren und damit die Integrität der Membran zerstören (141). Man bemühte sich deshalb um die Entwicklung modifizierter CD mit geringer Toxizität bei erhaltener Einschlußkörperbildung (141). Dimethyl- $\beta$ -Cyclodextrin, ein amphiphiles Derivat, bewirkt schon bei niedrigeren Dosen als reine CD toxische Erscheinungen wie Hämolyse. Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) und Sulfobutyläther- $\beta$ -Cyclodextrin (SBE- $\beta$ -CD) sind die zur Zeit bedeutendsten modifizierten Cyclodextrine. HP- $\beta$ -CD und SBE- $\beta$ -CD haben im Vergleich zum unsubstituierten  $\beta$ -CD eine höhere Löslichkeit bei geringer Toxizität (73,68). HP- $\beta$ -CD zeigte akute toxische Erscheinungen bei einer i.v. Dosis von  $> 10\text{g/Kg}$  bei Cynomolgus-Affen (142). Die beiden Substanzen unterscheiden sich durch ihre Interaktion mit anderen Pharmaka. HP- $\beta$ -CD verliert mit zunehmendem Maß an Hydroxypropylsubstitution an Bindungsstärke, wohingegen SBE- $\beta$ -CD mit zunehmendem Maß an

Sulfobutyl-Substitution an Bindungsstärke gewinnt. Dieser Unterschied ist bei der Medikamentendissoziation zu beachten.

Bei der Herstellung von Ophthalmika ist eine der Grundvoraussetzungen, daß die verwendeten Hilfsstoffe reizlos verträglich sind und sich auch nicht negativ auf die Hornhautoberfläche auswirken. Diesbezüglich konnte Kanai (65) bei seinen Untersuchungen zur Verträglichkeit von  $\alpha$ -CD schon bei Konzentrationen von >4% licht- und elektronenmikroskopische Veränderungen an der Korneaoberfläche nachweisen. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Janson (60) zur Verträglichkeit von 5-12% DM- $\beta$ -CD und 12,5% HP- $\beta$ -CD, zeigte schon bei der Applikation von 5% DM- $\beta$ -CD einen schädigenden Einfluß auf die Korneaoberfläche. Im Gegenteil hierzu konnte bei der Ein- und Mehrfachapplikation von 12,5% HP- $\beta$ -CD keine toxischen Schädigungen an der Korneaoberfläche festgestellt werden. Eine weitere elektronenmikroskopische Untersuchung von Freedmann (32) zur kornealen Toxizität bei der Applikation von 5% HP- $\beta$ -CD zeigte eine normale korneale Oberfläche ohne Verlust von Epithelzellen, Unterbrechung der Zellmembran oder Veränderung der Microvilli.

#### 2.2.4 Dissoziation

Faktoren, die die Interaktion zwischen Cyclodextrin-Einschlußkomplexen und Medikamenten beeinflussen, sind zum einen der Verdünnungseffekt, zum anderen das Vorhandensein von konkurrenzfähigen Agenzien. Welcher von diesen beiden Faktoren den entscheidenden Einfluß auf die prozentuale Bindung ausübt, ist von den Bindungskonstanten abhängig. Bei hoher Bindungskonstante überwiegen konkurrenzfähige Agenzien und bei niedriger der Verdünnungseffekt (141). Bei der parenteralen Anwendung bestimmt der Verdünnungseffekt hauptsächlich die Komplexdissoziation, ganz im Gegensatz zur ophthalmologischen Anwendung.

#### 2.2.5 Anwendung

Die orale Anwendung von Cyclodextrinen gründet sich darauf, daß sie die Bioverfügbarkeit von Medikamenten steigern (141). Cyclodextrine modifizieren die Medikamentenabgabe während der Magen-Darm-Passage und vermindern dort lokale Irritationen (141). Weiterhin erhöhen Cyclodextrine die orale Aufnahme durch verbesserte Permeation durch die Mukosa (141). Diese Permeabilitätsverbesserung wird durch eine Öffnung der tight-junctions erklärt (141). Modifizierte Cyclodextrine, die eine pH-abhängige Löslichkeit aufweisen, wurden mit dem Ziel einer selektiven Dissolution des CD-Medikamenten-Komplexes entwickelt (Säureschutz) (141). Ein Beispiel hierfür ist O-carboxymethyl-O-ethyl- $\beta$ -CD, welches eine limitierte Löslichkeit unter saurem pH zeigte (73). Dies führt während der Magen-Darm-Passage (MDP) zu einer gesteigerten Löslichkeit und Medikamentenabgabe mit steigendem pH-Wert (141).

Das Ziel dermatologischer, rektaler oder pulmonaler Anwendungen von Cyclodextrinen besteht in der lokalen Wirkungs-, Löslichkeits-, Stabilitäts- und Permeabilitätsverbesserung.

Bei der Herstellung von topischen Augenmedikamenten ist zu beachten, daß lipophile Substanzen die Kornea besser penetrieren als hydrophile Substanzen. Weiterhin ist zu beachten, daß lipophile Substanzen eine geringe Löslichkeit im Tränenfilm besitzen. Der Einsatz von CD-Molekülen bei der Zubereitung von Augentropfen gründet sich daher auf deren Eigenschaft, Einschlußkomplexe mit apolaren Substanzen zu bilden und hierdurch die Löslichkeit und Stabilität des Medikamentes zu verbessern (73). Die nachfolgende Übersicht zeigt eine Reihe experimenteller und klinischer Studien zur topischen Applikation von Augenmedikamenten im Zusammenhang mit Cyclodextrinen.

Tabelle 2: Topische Applikation von Augenmedikamenten im Zusammenhang mit Cyclodextrinen (modifiziert nach 84)

Medikament	Cyclodextrin	Literatur
Acetazolamid	HP- $\beta$ -CD	Lofsson et al. 1994 und 1996
Anandamide	HP- $\beta$ -CD	Jarho et al. 1996; Pate et al. 1996
Cannabinoide	HP- $\beta$ -CD	Pate et al. 1998
Cyclosporin A	$\alpha$ -CD	Kanai et al. 1989; Sasamoto et al. 1991; Cheeks et al. 1992
Dehydroepiandrosteron	HP- $\beta$ -CD	Kearse et al. 2001
Dexamethason	HP- $\beta$ -CD	Usayapante et al. 1991; Lofsson et al. 1994; Kristinsson et al. 1996; Gavrrilin et al. 1999
Diclofenac	HP- $\beta$ -CD, randomly M- $\beta$ -CD	Reer et al. 1994
Dipivefrin	SB- $\beta$ -CD	Jarho et al. 1997
Fluorometholon	HP- $\gamma$ -CD	Morita et al. 1996
Hydrocortison	HP- $\beta$ -CD	Davies et al. 1997, Bary et al. 2000
Loteprednol etabonat	HP- $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD	Reddy et al. 1996
Pilocarpin	$\alpha$ -CD, $\beta$ -CD, HE- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD	Freedman et al 1993; Järvinen et al. 1994,
Pilocarpin	SBE- $\beta$ -CD	Keipert et al. 1996; Siefert & Keipert 1997
Prostaglandine	HP- $\beta$ -CD	Wheeler 1991
Thalidomid	HP- $\beta$ -CD	Siefert et al. 1999
Tropicamid	HP- $\beta$ -CD	Capello et al. 2001
$\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol	$\alpha$ -CD, $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, $\gamma$ -CD	Green & Kearse 2000; Kearse & Green 2000

Die Größe der aufnehmbaren Substanz richtet sich nach der Anzahl der Glukoseeinheiten, welche den Innendurchmesser der Hohlräume bestimmt: 6( $\alpha$ -CD) 0,57 nm, 7( $\beta$ -CD) 0,78 nm, 8( $\gamma$ -CD) 0,95 nm (64). Die Größe des Thalidomid-Moleküls beträgt 0,7 nm, so daß  $\beta$ -CD theoretisch die geeignetesten sein sollten (73).

Wie wichtig es ist, daß die Größe des Thalidomidmoleküls mit der Größe des Cyclodextrin-Innendurchmessers korreliert, zeigt die ca. 30 mal stärkere löslichkeitsfördernde Eigenschaft von HP- $\beta$ -CD (>45g/100mL) gegenüber anderen Cyclodextrinen (73,78). Die Komplexbildung von HP- $\beta$ -CD mit Thalidomid führt zu einer Löslichkeitsverbesserung von 50  $\mu$ g/ml auf 1,7 mg/ml (78). Weil HP- $\beta$ -CD durch nonstöchiometrische Interaktionen mit Thalidomid reagiert, kann keine genaue Komplexbildungskonzentration sondern nur ein Konzentrationspektrum für jede Medikamentenkonzentration bestimmt werden (78).

Weiterhin bietet die Komplexbildung einen Schutz vor raschem Abbau instabiler Substanzen (78). HPLC-Untersuchungen (High performance liquid chromatography) haben gezeigt, daß nach 8 Stunden noch ca. 75% des Thalidomid-HP- $\beta$ -CD-Komplexes im Vergleich zu < 10% des freien Thalidomids vorhanden waren (78). Die Halbwertszeit von freiem Thalidomid wird durch hydrolytische Degeneration bestimmt. Komplexbildung von HP- $\beta$ -CD mit Thalidomid führt zu einer Halbwertszeitverbesserung von 2,1 Std. auf 4,1 Std. (78). Aus technischen Gründen wurde die Stabilität von eingefrorenem Thalidomid-HP- $\beta$ -CD im Vergleich zu neusynthetisierter Thalidomid-HP- $\beta$ -CD-Lösung untersucht, was zu identischen Konzentrationen führte.

Das Ausmaß der Komplexbildung zwischen HP- $\beta$ -CD und Thalidomid ist abhängig von der ursprünglichen Thalidomid-Konzentration (78). Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Thalidomid-Komplexierung und HP- $\beta$ -CD-Konzentration. Steigende HP- $\beta$ -CD-Konzentrationen korrelieren mit einer steigenden Anzahl an komplexierungsfähigen hydrophoben  $\beta$ -CD-Molekülen und der Konzentration des komplexierten Thalidomids. Bei 40% HP- $\beta$ -CD-Konzentration ist die maximale Komplexbildungsmöglichkeit und somit das Löslichkeitslimit erreicht. Weder längeres Schütteln noch unterschiedliche pH-Werte hatten einen Einfluß auf die Thalidomid-Komplexierung. Temperaturerhöhungen auf 70°C steigerten die Komplexbildung, was zu einer löslichen Cyclodextrin-Thalidomid-Komplex-Konzentration von 4mg/ml führte. Die Verwendung von reinen Enantiomeren, die

eine 5 mal höhere Löslichkeit als racemisches Thalidomid besitzen, führte bei Zimmertemperatur zu einer löslichen Cyclodextrin-Thalidomid-Komplex-Konzentration von 3,5mg/ml. Die Kombination von hoher Temperatur und die Benutzung von Enantiomeren führte zu einer weiteren Konzentrationssteigerung. Zur optimalen Komplexbildung von HP- $\beta$ -CD mit einem Wirkstoff wird ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 benötigt (127). Dieses stöchiometrische Verhältnis zwischen HP- $\beta$ -CD und einem Wirkstoff wurde auch in einer Pilocarpinstudie bestätigt (32).

## 2.3 Thalidomid

### 2.3.1 Struktur

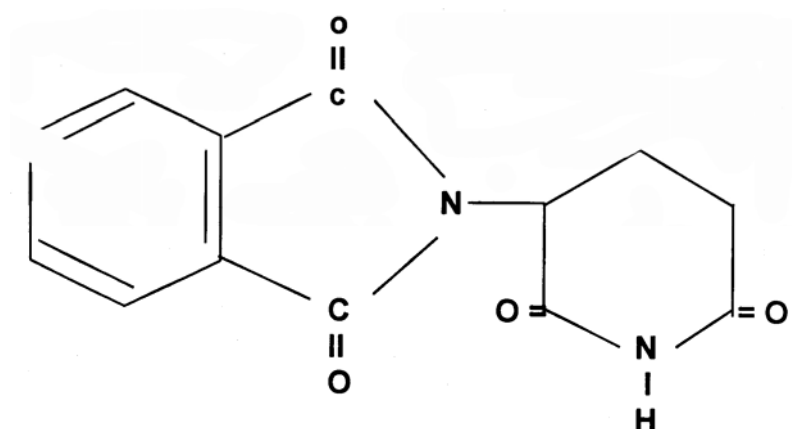


Abbildung 6: Thalidomidstruktur

Thalidomid (2-(2,6-dioxo-piperidin-3-yl)-iso-endol-1,3-dion) besteht aus einem Benzen-, Glutarimid- und einem Phthalimid-Ring, hat 4 Carboxylgruppen und eine substituierte Amid-Verbindung.

Thalidomid hat ein chirales Zentrum und existiert als racemische Mischung, aus einem (+)-(R)-Enantiomer und einem (-)-(S)-Enantiomer. Viele Studien haben sich mit der Enantiomer-spezifischen Wirkung von Thalidomid auseinandergesetzt, was aber letztlich durch die hohe Thalidomidrazemisierungs-Geschwindigkeit unter physiologischen Bedingungen ( $t_{1/2} = 2,25$  Stunden) (29) an Bedeutung verlor. Ein neuer Ansatz zur Umgehung dieser Problematik ist die Produktion eines konfigurationsstabilen-Thalidomid-Analogons durch Methylierung des chiralen Kohlenstoffs. Neuere Studien haben gezeigt, daß das konfigurationsstabile (S)-Enantiomer für die Immunmodulation, Teratogenität (10) und Sedation verantwortlich ist.

### 2.3.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Die wesentlichen Eigenschaften von Thalidomid liegen in seiner geringen Löslichkeit (50 µg/ml) (78) und seiner hydrolytischen Instabilität bei physiologischem pH-Wert.

#### 2.3.2.1 Löslichkeit

Die Thalidomidlöslichkeit in wässriger Lösung beträgt 50 µg/ml (78). Die orale Einnahme von 800mg/Tag racemischen Thalidomids in Form von Tabletten führt zu einer Serumkonzentration von max.~ 5 µg/ml (78).

Die geringe Löslichkeit des Thalidomids ist nicht durch die lipophile Struktur begründet, da ein log P von 0,28 auf eine Verteilung zwischen lipophiler und wässriger Phase von 2:1 hindeutet. Auch bei der Betrachtung der Struktur würde man durch das Vorliegen der 4 Carboxylgruppen eher eine hohe Löslichkeit vermuten, aber gerade diese Carboxylgruppen interagieren mit Wasserstoffverbindungen, welche die Löslichkeit entscheidend vermindern. Ein weiterer Aspekt des Thalidomids ist die unterschiedliche Löslichkeit der racemischen Form und der reinen Enantiomeren. Die reinen Enantiomere sind bis zu 5 mal löslicher als die racemische Form (78). Die höhere Löslichkeit des reinen Enantiomers ist nicht nur entscheidend für die Absorption sondern auch für die Toxizität von Thalidomid. Die reinen Enantiomere zeigen toxische Wirkungen (LD 50= 0,5g/kg), während die racemische Form bei einer Dosis von 10g/kg keinerlei Toxizität aufweist.

### 2.3.2.2 Hydrolytische Instabilität

Der rasche Wirkungsverlust von Thalidomid ist durch seine hydrolytische Instabilität bei pH-Werten oberhalb von 6 begründet. Die Geschwindigkeit der spontanen Hydrolyse wird mit zunehmendem pH-Wert gesteigert ( bei pH= 7,4 28% nach einer Stunde und fast 100% in 24 Stunden, bei pH=8 66% innerhalb der 1. Stunde) (114). Folglich ist bei erhöhtem pH-Wert die Halbwertszeit von Thalidomid vermindert ( pH 7= 11 hr., pH 7,4= 5 hr., pH 8= 1,25 hr.) (114). Der Angriffspunkt der Hydrolyse sind die substituierten Amid-Verbindungen, die Unterschiede in ihrer Sensitivität aufweisen. Bei einem pH-Wert zwischen 6 und 7 betrifft die hydrolytische Spaltung nur den Phthalimid-Ring, während bei pH-Werten über 7 auch der Glutarimid-Ring angegriffen wird. Deshalb findet man neben dem Hauptmetaboliten  $\alpha$ -(o-carboxybenzamido)-Glutarimid pH-Wert-abhängig noch 12 weitere Metaboliten, die zwar eine höhere Polarität (78), aber eine hydrolytische Instabilität wie Thalidomid selbst aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen ist  $\alpha$ -(o-carboxybenzamido) Glutarimid das stabilste der Hydrolyse-Produkte 1. Grades und macht nach 4 Stunden 47,5% der Gesamtmetaboliten aus (78). Ein weiterer Faktor, der die Hydrolyse beeinflusst, ist die Temperatur. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C waren nur noch 26,1% des ursprünglichen Thalidomids intakt, während bei sonst gleichen Bedingungen bei einer Temperatur von 23 °C noch 78,8% zu verzeichnen waren (78).

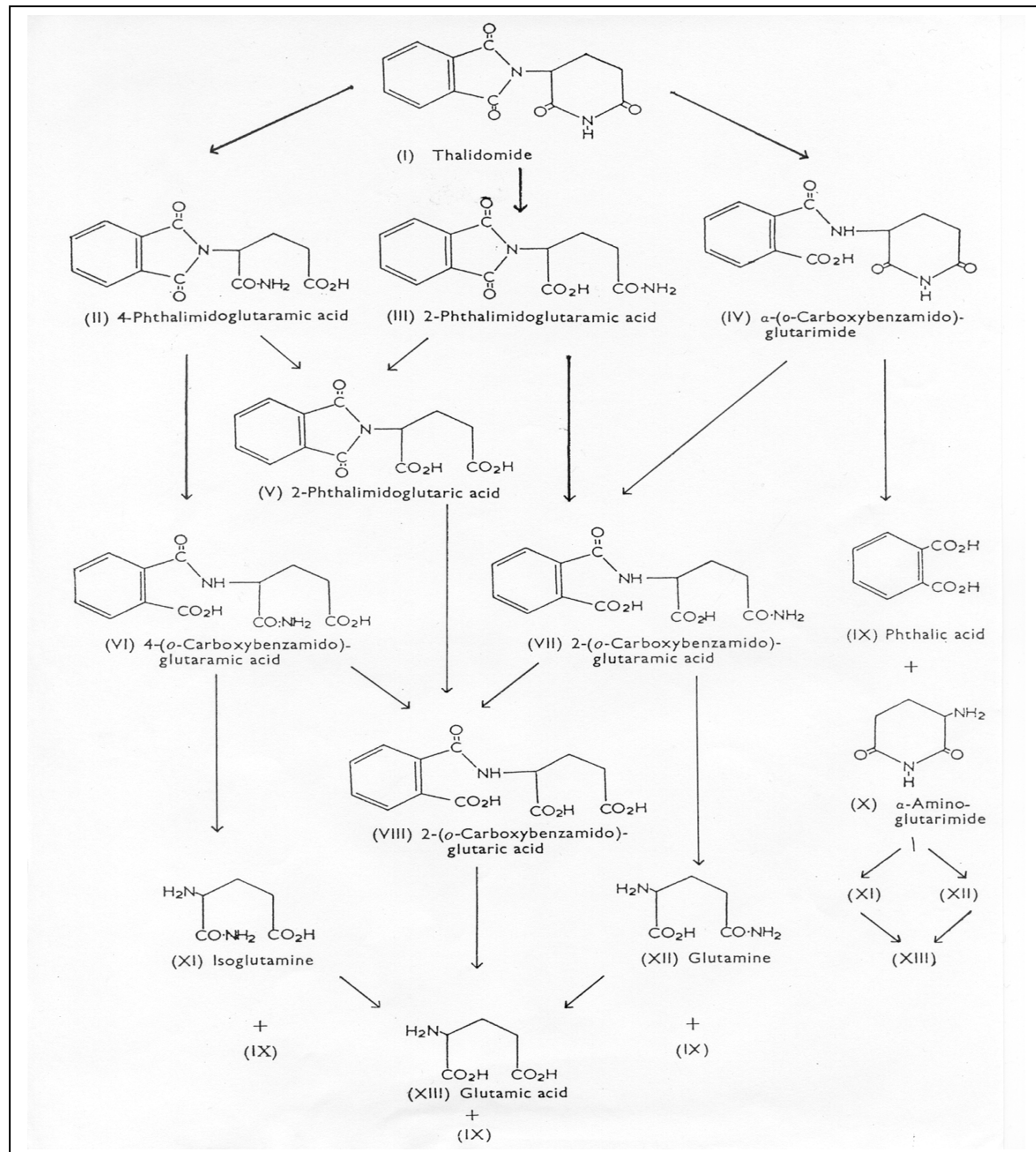


Abbildung 7: Spontane Hydrolyse des Thalidomids (aus 78)

### 2.3.3 Wirkung

Seit der Rücknahme vom Markt 1961 wurden mehr als 5000 Arbeiten über Thalidomid publiziert. Davon beziehen sich ungefähr 1500 auf seine therapeutische und ungefähr 2000 auf seine teratogene Wirkung (128). In den letzten 2-3 Jahren wurden ca. 100 verschiedene Studien bei 40 verschiedenen Erkrankungen ausgeführt (102). 1991 identifizierten Wissenschaftler der Rockefeller Universität, N.Y., Thalidomid als einen Inhibitor von  $\text{TNF-}\alpha$  (102), 1994 wurden die ersten inhibitorischen Effekte auf die Angiogenese festgestellt (117), 1996 folgten erste Berichte über Thalidomidanaloga (85), 1998 wurde zum ersten mal sein kostimulatorischer Effekt auf  $\text{CD8+}$ -Zellen beschrieben (50), und 1998 wurde das Medikament zur Behandlung von Lepra von der FDA anerkannt (85).

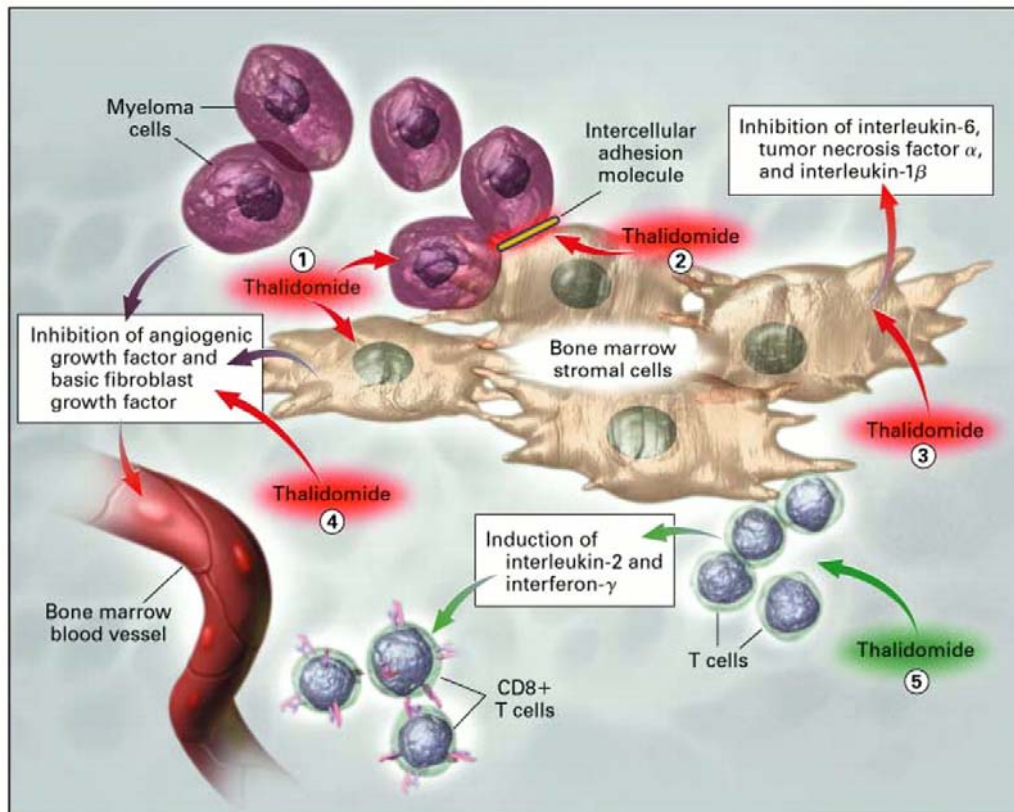


Abbildung 8: Mögliche Wirkungsmechanismen des Thalidomids (100)

1. Wachstums- und Lebensdauermodifikation von Tumorzellen (97)
2. Modifizierung der Adhäsionsmoleküle (20)
3. Modifizierung von Zytokinen (16)
4. Angiogeneseinhibition (11)
5. Immunmodulatorische Steigerung der Anzahl an  $\text{CD8+}$ -T-Zellen (16)

#### 2.3.3.1 $\text{TNF-}\alpha$ -Inhibition

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ist ein Zytokin, das für die Immunantwort aber auch für die Pathogenese von Infektionen und Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Erhöhte Werte dieses und anderer proinflammatorischer Zytokine können zu ernsthaften Erkrankungen führen. Ein Beispiele hierfür ist der Endotoxin-induzierte Schock, bei dem eine Assoziation zwischen erhöhten Zytokin-Werten und akutem Multiorganversagen besteht (18). Die Behandlung eines Schocks ist neben anderen Interventionen von der totalen Hemmung von Zytokinen wie  $\text{TNF-}\alpha$  abhängig (123,136).

Thalidomid ist ein partieller Inhibitor von  $\text{TNF-}\alpha$  in-vivo. Thalidomid inhibiert die durch Monozyten im



peripheren Blut produzierte TNF- $\alpha$ , nachdem diese von Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert wurden. Thalidomid hemmt partiell, dosisabhängig und selektiv die Produktion von TNF- $\alpha$  in menschlichen Monozyten, ohne die Proteinsynthese oder die Produktion von anderen Zytokinen zu beeinflussen (92,106). Die TNF- $\alpha$ -Inhibition durch Thalidomid ist nicht vollständig (68,92). Thalidomid verringert die TNF- $\alpha$ -Produktion von Monozyten in-vitro (68,92) und vivo bei 50-70% (18). Es hat den Anschein, daß Thalidomid die TNF- $\alpha$ -Produktion durch den Abbau der TNF- $\alpha$ -mRNA verringert (92). Thalidomid reduziert die Halbwertszeit der TNF- $\alpha$ -mRNA von ungefähr 30 auf 17 Minuten (92). Der inhibitorische Effekt von Thalidomid auf die TNF- $\alpha$ -Produktion scheint sowohl stimulationsabhängig als auch von der produzierenden Zellart abhängig zu sein (57).

Die inhibitorische Fähigkeit von Thalidomid auf TNF- $\alpha$  in-vitro läßt sich nicht immer in-vivo nachvollziehen. Zudem ist es schwierig, TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Patientenserum zu bestimmen. Bis heute gibt es keinen Referenzbereich für dieses Zytokin, die Sekretion verläuft phasisch, und TNF- $\alpha$  hat eine kurze Halbwertszeit (22,129). Außerdem gibt es zwei aktive Formen von TNF- $\alpha$ , ein membrangebundenes Protein und einen zirkulierenden Homotrimer, wovon nur der letztere gemessen wird (22,129). Es ist daher zu vermuten, daß die Serumkonzentration von TNF- $\alpha$  nicht seine wirkliche Aktivität widerspiegelt (57). Zudem haben mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen Thalidomid und einer erhöhten (!) TNF- $\alpha$ -Konzentration demonstriert (39,57,59,149).

Trotz dieser Diskordanz zeigt Thalidomid Effekte bei Erkrankungen, die mit TNF- $\alpha$  in Verbindung stehen.

### 2.3.3.2 T-Zellen

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Thalidomid ist seine Wirkung auf T-Lymphozyten. Thalidomid wirkt kostimulatorisch auf die T-Zell-Aktivierung (17,50), was zu einer Erhöhung von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) führt (17).

Diese kostimulatorische Wirkung scheint eine größere Auswirkung auf die CD8- als auf die CD4-Zellen zu haben. Diese Vermutung korreliert mit einer Studie an gesunden männlichen Probanden, bei denen ein vermindertes Verhältnis von CD4-Zellen/CD8-Zellen gefunden wurde (37). Thalidomid interagiert in-vitro mit T-Helfer-Zellen, wirkt inhibierend auf Typ 1-zelluläre-Immunität (IL-2, INF $\gamma$ ) und induzierend auf Typ 2-humoral-Immunität (IL-4, IL-5, IL-10) in Antigen- und Mitogen-stimulierten-Monozyten im peripheren Blut (90). Thalidomid hat auch einen Effekt auf die Interleukin-12 (IL-12)-Produktion. Interessanterweise vermindert Thalidomid die IL-12-Produktion von Monozyten im peripheren Blut, wenn diese durch LPS stimuliert werden, aber erhöht diese, wenn sie durch den T-Zell-Rezeptor stimuliert werden (17). Die Vermutung, daß Thalidomid eine Rolle in der Interferon- und Interleukin-Produktion spielt, ist vor allem wichtig in der Onkologie, wobei diese Zytokine prognostisch relevant sind (57).

### 2.3.3.3 Antiangiogenese

Die Angiogenese ist wichtig für physiologische, aber auch verantwortlich für pathologische Vorgänge. Die Angiogenese ist eine Voraussetzung für das Wachstum von Follikel und Corpus luteum bei der Embryogenese sowie der Wundheilung, aber auch die Ursache der Erblindung bei diabetischer Retinopathie sowie des Wachstums von Tumoren.

Stimulatoren der Angiogenese sind u.a. VEGF (vaskulär-endothelialer-Wachstumsfaktor), Fibroblast Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor- $\beta$ , und Platelet-Derived Growth Factor (9). Diese Faktoren werden bei Gewebeminderperfusion mit nachfolgender Hypoxie ausgeschüttet und stimulieren die Neubildung von Gefäßen (9). Inhibitoren der Angiogenese sind Angiostatin, ein Plasminogen-Fragment, Anti-Integrin, Metalloproteinasen, Protease-Inhibitoren sowie auch Thalidomid (9).

Eine von vielen Theorien der teratogenen Wirkung des Thalidomids besteht in der Hemmung der Angiogenese, ohne welche keine Gliedmaßen ausgebildet werden können. Die vermutete Ursache für eine der schlimmsten Tragödien der Medizin wäre dann genau der gleiche Effekt, der heute bei bestimmten Krankheiten durchaus erwünscht ist. Mehrere Modelle haben die Effektivität des Thalidomids und seiner Analoga als Angiogeneseinhibitoren bei der Korneaneovaskularisation gezeigt (79). Weiterhin hat die Inhibition des VEGF und anderer antiangiogen wirksamer Substanzen im Tiermodell ihre

Effektivität bei der Verbesserung der okularen Neovaskularisation und retinalen Leakage bei AMD demonstriert (33).

Es wird vermutet, daß Thalidomid Adhäsionsrezeptoren wie Beta-Integrine und Selectin beeinflusst, die sowohl für die Immunsuppression als auch für die Angiogenese bedeutsam sind. Es hat sich herausgestellt, daß Beta-Integrine durch bFGF- und VEGF-stimulierte Angiogenese auch bei der proliferativen diabetischen Retinopathie von Bedeutung sind (35,19,89). Thalidomid moduliert die Expression von Adhäsionsmolekülen an Leukozyten, Lymphozyten sowie Endothelzellen (35).

Thalidomid inhibiert durch  $\text{TNF-}\alpha$  die Induktion von VCAM-1 (Vascular-cell-adhesion-molecule 1) und E-selectin bei Endothelzellen (79).

#### 2.3.3.4 Immunmodulation

Immunologisch verursachte Erkrankungen bereiten erhebliche therapeutische Probleme. Eine dieser Erkrankungen ist die Uveitis, welche durch eine akute Infiltration von inflammatorischen Zellen, vor allem Neutrophilen und Makrophagen, aber auch T-Lymphozyten, in die vordere Augenkammer sowie den Glaskörper gekennzeichnet ist. Die Bedeutung der T-Lymphozyten in der Pathogenese der Uveitis belegte eine Studie von Kogiso (75) zur Endotoxin-induzierten Uveitis an Mäusen (75), bei der eine signifikante Reduktion von Zellzahl und Proteinen im Kammerwasser durch Vorbehandlung mit anti-Thy-1.2-Antikörpern erzielt wurde. Anti-CD4-Antikörper, nicht aber Anti-CD8-Antikörper vermindern das Ausmaß der Erkrankung. Die Rolle der T-Zellen in der Pathogenese der Uveitis ist nicht klar, aber es hat den Anschein, daß T-Lymphozyten bestimmte Zytokine ausschütten, die für den Entzündungsprozeß wichtig sind (148).

Es gibt nur wenige Autoren, die sich mit der inhibitorischen Wirkung des Thalidomids bei intraokularer Inflammation beschäftigen. Das Tiermodell der Endotoxin-induzierten Uveitis von Guex Crosier (44) gibt uns die Möglichkeit die Thalidomidtherapie bei okularen Infektionen zu studieren. Zur Induktion einer akuten Uveitis wurden Ratten mit einer Lipopolysaccharidininjektion (LPS) behandelt. Als Entzündungsparameter wurden Proteingehalt und Zellzahl in der vorderen Augenkammer bestimmt. Die Studie zeigte, daß hochdosiertes Thalidomid (300-400mg/kg), nicht aber niedrig dosiertes Thalidomid (150mg/kg) eine signifikante antiinflammatorische Wirkung besitzt (44). In-vitro-Studien an isolierten mit LPS stimulierten Monozyten zeigten, daß Thalidomid  $\text{TNF-}\alpha$  durch einen vermehrten Abbau der mRNA vermindert. Andere Mechanismen, die zu dieser anti-inflammatorischen Reaktion führen können, sind die Verminderung von zytotoxischen T-Zellen ( $\text{CD8} + \text{CD56} + \text{CDw29}^+$ ) und die Erhöhung von Suppressor-T-Zellen ( $\text{CD8} + \text{CD56} - \text{CDw29}^+$ ) (44).

Bei einer über 15 Jahre durchgeführten Studie an Leprapatienten mit reaktiver Iritis und Iridozyklitis ergab die Kombination von Thalidomid und lokalen Steroiden eine Verminderung der Augenschmerzen sowie eine Verkürzung der Symptombdauer (118).

Eine neuere Studie von Baatz (7) zum inhibitorischen Effekt des Thalidomid bei Endotoxin induzierter Uveitis bei Ratten zeigte, daß Thalidomid durch die Modulation der Leukozyten-Endothel-Interaktion seine antiinflammatorische Wirkung entfaltet.

#### 2.3.4 Unverträglichkeit und Toxizität

Die Nebenwirkungen des Thalidomids sind ein wichtiger Faktor für den Behandlungsabbruch einer effektiven Therapie. Die meisten Nebenwirkungen sind geringfügig und dosisabhängig. Die häufigsten Nebenwirkungen von Thalidomid sind dosisabhängiger Schwindel und Somnolenz (134,138). Der durch Thalidomid verursachte Schwindel scheint in Zusammenhang mit der hypotensiven Wirkung dieses Medikaments zu stehen und kann durch erhöhte Trinkmengen und langsames Aufrichten aus der liegenden Position positiv beeinflusst werden (57). Patienten entwickeln eine Toleranz gegenüber dem dämpfenden Effekt von Thalidomid (57). Eine weitere häufige Nebenwirkung ist Obstipation, die bei 3-30% aller Patienten auftritt (57).

Die wichtigste Nebenwirkung, die auch am häufigsten zum Therapieabbruch führt, ist die periphere Neuropathie (31,53,80,125). Es handelt sich hierbei um eine Axondegeneration ohne Demyelinisierungsvorgänge in den sensorischen Fasern der unteren und oberen Extremitäten (57). Histologisch finden wir eine Reduzierung der Anzahl der myelinisierten Fasern und eine Erhöhung der

dünnen unmyelinisierten Fasern (36).

Periphere Neuropathie tritt auf in 73% bei Lupus erythematodes-Patienten (146), in 12% bei Rheumatoider Arthritis (46), in 5% bei HIV-Infektion (51), in 14-50% bei idiopathischen Ulzerationen und bei Behçet-Syndrom (38) und in durchschnittlich 25% bei allen nichtlepraerkrankten Patienten bei langfristiger Thalidomidtherapie (57). Eine Studie an 60 Patienten, die aufgrund eines chronischen diskoiden Lupus erythematodes (DLE) mit einer täglichen Thalidomiddosis von 50-100 mg behandelt wurden, betrug die Inzidenz der symptomatischen Neuropathie 20% (72). Über das Auftreten von Neuropathie wurde schon bei so geringen Dosen wie 3 mg berichtet (94). Es hat den Anschein, daß die Häufigkeit von peripherer Neuropathie dosisabhängig und zum Teil irreversibel ist (53,36).

In der Dermatologie werden Ausschläge am Oberkörper ohne Juckreiz beschrieben, die zwischen dem 2. und 13. Behandlungstag auftreten und nach Behandlungsabbruch wieder rückläufig sind (21). Von der Temple Universität (Philadelphia) wurde ein Bericht über 2 Patienten mit transplantationsbedürftigen Beinulzerationen berichtet, nachdem diese wegen Graft-versus-host-disease mit Thalidomid behandelt wurden (109). Eine randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie an 96 männlichen Patienten, die Thalidomid zur Behandlung des Behçet-Syndroms einnahmen, ergab eine erhöhte Inzidenz an Erythema nodosum in der Thalidomidgruppe (143). Diese Tatsache wurde auch von anderen Autoren beschrieben (108, 144). Auch über lebensgefährliche epidermale Schäden wurde berichtet (21).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Versuchstiere

Männliche pigmentierte Kaninchen mit einem Gewicht von 1,0-1,5 kg (4 - 6 Wochen alt) wurden von der Firma Charles River Deutschland GmbH (Kißlegg) erworben. Die Tierhaltung und Handhabung war standardisiert und richtete sich nach den Anforderungen des Deutschen Tierschutzgesetzes (12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus, freier Zugang zu Wasser und Futter, etc.). Die Durchführung der Versuche wurde von der zuständigen Behörde des Landes Berlin genehmigt.

#### 3.2 Entnommene Gewebe und Flüssigkeiten

Kornea

Konjunktiva

Sklera

Retina

Iris-Ziliarkörper

Kammerwasser

Glaskörper

Plasma

#### 3.3 Materialien, Chemikalien, Medikamente

##### Materialien:

Sterile Einmal-Insulin-Kanülen (Sterican®) 0,45 x 12mm	B.Braun, Melsungen AG
Sterile Einmal-Injektions-Kanülen (Sterican®) 0,90 x 40mm	B.Braun, Melsungen AG
Sterile Feindosierungsspritze (Omnifix®) 1ml	B.Braun, Melsungen AG
Sterile Einmalspritzen 5ml	B.Braun, Melsungen AG
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

##### Chemikalien und Medikamente zur Herstellung der Augentropfen:

Thalidomid Racemat	Firma Grünenthal GmbH, Stolberg
(Hydroxypropyl)- $\beta$ -Cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD)	Wacker Chemie, München
Hydroxypropyl Methylcellulose (Pharmacoat 606®)	
Natriumchlorid	
Salzsäure	

Benzalkoniumchlorid-Lösung 0,1%

Steriles Wasser

Medikamente und Chemikalien zur Behandlung der Versuchstiere:

Xylazinhydrochlorid (Rompun®) 2%	Bayer AG, Leverkusen
Ketaminhydrochlorid (Ketanest®)	Parke, Davis & Company, Berlin
Hexobarbital	AMD, Dresden
Pentobarbital	Synopharm, Barsbüttel
Kaliumchlorid 7,45% (20ml)	B. Braun, Melsungen AG
Isotonische Natriumchlorid-Lösung	Delta Pharma GmbH, Pfullingen

Chemikalien für die mobile Phase für HPLC:

Acetonitril (HPLC grade)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Wasser	

Puffer: (20°C)

Phosphat-Pufferlösung pH 5,5 und pH 2,0	Ph.Eur.1997
Citrat-Pufferlösung pH 4,0	Caelo, Hilden
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Synopharma, Barsbüttel

### 3.4 Geräte

Analysenwaage	Nagema, VEB Großwaagen, Berlin
Zentrifuge T 54	MLW
Ultra Turrax T25	IKA-Labortechnik, Staufen i. Breisgau
Homogenisierung der Festbestandteile	
HPLC-System L 6200 A mit UV/VIS-Detektor	Merck-Hitachi Tokyo, Japan

## Herstellung der Augentropfen

Die verwendeten Augentropfen wurden vor der Anwendung frisch und unter aseptischen Arbeitsbedingungen hergestellt.

<b>Thalidomid-Suspension (THA-SP)</b>	g/100g
Medikament Thalidomid-Racemat	0,04
Stabilisator	
Hydroxypropyl methylcellulose (Pharmacoat 606®)	0,50
Natriumchlorid	0,90
Salzsäure (0,01N) (→ pH 4,5)	q.s. (so viel wie nötig)
Konservierung	
Benzalkoniumchlorid-Lösung 0,1%	10,0
Steriles Wasser für Injektion ad	100,00
 <b>Thalidomid-Cyclodextrin (THA-CD)</b>	 g/100g
Medikament Thalidomid-Racemat	0,04
Stabilisator	
Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	12,50
Natriumchlorid	0,34
Salzsäure (0,01N) (→ pH 4,5)	q.s. (so viel wie nötig)
Konservierung	
Benzalkoniumchlorid-Lösung 0,1%	10,0
Steriles Wasser für Injektion ad	100,00

12,50 g HP-β-CD und 0,34 g NaCl wurden mit 10,00 g (0,1% BAC-Stammlösung) versetzt. Anschließend wurde 67,16 g Wasser für Injektionszwecke dazu gegeben und mittels Magnetrührer gerührt bis zur Lösung aller Feststoffe. Die Hälfte der Lösung (45g) wurden mit HCL (0,01 mmol-l-1) auf einen pH-Wert von ca. 4,5 eingestellt und mit 5,0 g Wasser aufgefüllt. Im Anschluß wurde die Lösung in eine Spritze aufgezogen und durch einen 0,2 µm Sterilfilter in sterile Augentropfenflaschen filtriert. (CD sine)

0,04 g THA wurde zur anderen Hälfte der CD Lösung dazugegeben und für 1,5 h mittels Magnetrührer gerührt. Der pH-Wert wurden mit HCL (0,01 mmol-l-1) auf einen pH-Wert von ca. 4,5 eingestellt. 4,96 g Wasser wurden zugesetzt und ungelöste THA Anteile wurden abfiltriert. Anschließend wurde die Lösung in sterile Endbehälter abgefüllt. (THA-CD)

0,50 g HPMC und 0,90 g NaCl wurden mit 10,00 g (0,1% BAC-Stammlösung) versetzt. 78,60 g Wasser wurden zugesetzt und die Lösung wurde bei 121°C bei 2 bar über 15 Minuten dampfsterilisiert. Die eine Hälfte der Lösung wurde mit HCL (0,01 mmol-l-1) auf einen pH-Wert von ca. 4,5 eingestellt und mit 5,0 g Wasser aufgefüllt. Jeweils 10 g der Lösung wurde in eine Augentropfenflasche abgefüllt. (SP sine).

0,04 g THA wurde gemeinsam mit der anderen Hälfte der Lösung auf einem Glasmörser in kleine Anteile verrieben und vorsichtig suspendiert. Der pH-Wert wurde mittels HCL (0,01 mmol-l-1) auf ca. 4,5 eingestellt. Anschließend wurde 4,98 g Wasser für Injektionszwecke zugesetzt und die Mischung in

Augentropfenflaschen überführt. (THA-SP).

### 3.5 Behandlung der Versuchstiere

Es wurden insgesamt 21 Versuchstiere für das Experiment verwendet. Die Kaninchen wurden mit Rompun® sediert und mit den entsprechenden Augentropfen und Zeiträumen (30-, 60- und 240minütige Einwirkzeit) behandelt.

Tabelle 3: Versuchstiere

Tier	Einwirkungszeit	Behandlung
1	1Stunde	THA/HP-β-CD
2	1Stunde	THA-Suspension
3	4Stunden	THA/HP-β-CD
4	4Stunden	THA-Suspension
5	4Stunden	THA/HP-β-CD
6	4Stunden	THA-Suspension
7	4Stunden	THA/HP-β-CD
8	4Stunden	THA-Suspension
9	1Stunde	THA/HP-β-CD
10	1Stunde	THA-Suspension
11	1/2 Stunde	THA/HP-β-CD
12	1/2 Stunde	THA/HP-β-CD
13	1/2 Stunde	THA/HP-β-CD
14	1/2 Stunde	THA-Suspension
15	1/2 Stunde	THA-Suspension
16	1/2 Stunde	THA-Suspension
17	1Stunde	THA/HP-β-CD EM Studie
18	1Stunde	THA-Suspension EM Studie
19	1Stunde	Suspension EM Studie
20	1Stunde	HP-β-CD EM Studie
21	1Stunde	Ohne Behandlung

Die Applikation der Augentropfen erfolgte in einem Zeitraum von 5 Minuten, in dem insgesamt 5 Augentropfen à 50 µl im Intervall von je einer Minute eingebracht wurden. Zur Verbesserung der Aufnahme und Verteilung wurde das Unterlid während der Applikation vom Augapfel abgehoben und danach ein künstlicher Lidschlag induziert. Diese Vorgehensweise verhindert den Verlust überschüssigen Materials. Zusätzlich wurde ein leichter Druck gegen die Lider und die Nasalgegend ausgeübt, um den schnellen Abfluß über den Tränenkanal zu verhindern und systemische Wirkungen zu vermeiden. Die Kaninchen wurden noch einige Zeit nach der Applikation gehalten und beobachtet, um sicherzustellen, daß sie ihre Augen nicht mit den Pfoten reiben. Nach der entsprechenden Einwirkzeit wurden die Augen mit isotonischer Natrium-chloridlösung gespült, um restliche Augentropfen zu entfernen. Die Tiere wurden danach mit Natrium-Hexobarbital eingeschläfert. Nach Aussetzen der Herztätigkeit wurde mit einer Insulinspritze ca. 150-200 µl Kammerwasser und 5 ml Blut (nur bei 2 Tieren) entnommen. Die Augen wurden enukleiert und präpariert. Die okularen Gewebe: Konjunktiva, Kornea, Iris-Ziliarkörper, Glaskörper, Retina und Sklera wurden isoliert und in tarierte Behälter überführt und bei -84 °C tiefgefroren. Die Gewebeaufbereitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.9 beschrieben, gefolgt von einer Gehaltsbestimmung mittels HPLC.

### 3.6 Einfrieren und Auftauen der Materialien

Die frisch entnommenen Proben wurden sofort nach der Enukeleierung und Separierung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -84 Grad (GFL 6380, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) bis zur HPLC-Gehaltsbestimmung eingefroren.

### 3.7 HPLC- Gehaltsbestimmung von Thalidomid

Die quantitative Thalidomid-Gehaltsbestimmung in den unterschiedlichen Untersuchungsproben wurde mit der modifizierten Reverse-phase-HPLC-Methode durchgeführt (Erikson et al. 1992). Es wurden mit den jeweiligen Medien Kalibrierungsstandardlösungen (externer Standard) hergestellt.

Die verschiedenen Gewebe wurden bei einer Wellenlänge von 300 nm mit dem Merck Hitachi-HPLC system L 6200, ausgestattet mit einem UV/VIS-Detektor (Tokyo, Japan) und einem Injektionsvolumen von 20 µl gemessen. Die mobile Phase (Flußgeschwindigkeit 1,2 ml/min) bestand aus 30% Acetonitril und 70% Wasser. Die Separierung wurde mit einer Guard Column und einer analytischen LiChrospher column RP-18, 5 µm, 125mm I.D., (beide von der Firma E. Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die HPLC-Kalibrierung wurde mit 50, 100, und 400 ng Thalidomid/ml Kammerwasser durchgeführt. Die Detektion des Thalidomid-Gehaltes wurde bei einer Wellenlänge von 300 nm durchgeführt. Das Detektionslimit lag bei 50 ng/ml.

Tabelle 4: HPLC – Gehaltsbestimmung (THA) (modifiziert nach 30)

Pumpe	Pump L 6200 A, E. Merck – Hitachi (Tokio, J)
Detektor	UV - Detector L 4000, E. Merck - Hitachi (Tokio, J)
Interface	Interface D 6000, E. Merck – Hitachi (Tokio, J)
Software	D 6000 HPLC-Manager Version 2, Rev. 3, E. Merck (Darmstadt) & Hitachi Instr. Inc. (San Jose, CA, USA)
Injektionsvolumen	20 µl Rheodyne® 7161, (Cotati, CA, USA)
Stationäre Phase	LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm (I. D.), (20°C), E.Merck (Darmstadt)
Mobile Phase	30% Acetonitril / 70% Wasser (20°C)
Externer Standard	THA
Flußrate	1.2 ml / min.
Wellenlänge	300 nm (220 nm)

Für die Thalidomid-Gehaltsbestimmung der entnommenen Materialien mußte zwischen den flüssigen und soliden Bestandteilen unterschieden werden. Die flüssigen Bestandteile des Kaninchenauges konnten direkt injiziert werden, wogegen die soliden Gewebe vor der Injektion eine Gewebeaufarbeitung benötigten.

### 3.8 Gewebeaufarbeitung

In Anbetracht der geringen Menge an unbehandelten okularen Geweben des Kaninchenauges wurden Wirkstoff-Wiederfindungsraten an isolierten Geweben des Rinderauges bzw. an Rattenplasma bestimmt (121). Das Gewebeaufarbeitungsverfahren wurde in Vorversuchen, entsprechend der höchsten Wiederfindungsrate, ausgewählt. Die Aufarbeitung erfolgte entweder durch Homogenisierung oder saurer Digestion.

Das Rinderkornea-Permeationsmodell (120) und das in vitro-Modell (isolierte Schweinekornea) ermöglichte die Untersuchung der Wirkstoffaufnahme in Abhängigkeit von der Wirkstofflösung, ins Gewebe. Hierfür wurde das Gewebefeuchtgewicht bestimmt, Gewebeteile mit wirkstoffhaltiger Lösung über einen festgelegten Zeitpunkt unter konstanten Bedingungen geschüttelt, und nach Dekantierung der Inkubationslösung der Wirkstoffgehalt bestimmt. Die Differenz zwischen bekannter Wirkstoffmenge in der Ausgangslösung und gefundener Konzentration nach Inkubation, ermöglicht die Berechnung der im Gewebe vorliegenden Wirkstoffmenge pro Gewebe.

#### 3.8.1 Kornea

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate des Wirkstoffs in der Kornea wurde von einer bestimmten Anzahl an zerkleinerten Rinderkorneae das jeweilige Kornea-Feuchtgewicht bestimmt. Diese Gewebeteile



wurden mit jeweils 1.0 ml gesättigter THA/PP+ pH 4.5-Lösung versetzt und 3h bei 33°C geschüttelt (107rpm). Anschließend wurden sie mit 500 µl PP+ pH 4.5 abgespült, kurz in diesen Puffer eingetaucht und danach bei 84°C tiefgefroren. Mittels HPLC wurde bei einem Endvolumen von 1,5 ml der THA-Gehalt bestimmt und hieraus die penetrierte THA-Menge calculiert.

Die Kaninchenproben wurden aufgetaut, mit einer Präparationsschere (Aesculap BC 100) zerschnitten und in Plastik-Zentrifugengläser überführt. Jeder Kornea wurden 1.5 ml einem Gemisch aus PP pH 2.0 und DMSA (3+7) zugesetzt und 30 min stengelassen. Anschließend wurden die Gewebeteile unter Eiskühlung mit einem hochtourigen Rührwerk (Ultra Turrax T 25, IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.) 5 min lang homogenisiert und die Mischung im Anschluß bei 4°C 30 min bei 12.000 rpm zentrifugiert (Hermle ZK 380, Gosheim). Der klare Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und darin der THA-Gehalt mittels HPLC bestimmt.

### 3.8.2 Konjunktiva

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate in der Konjunktiva wurde wie bei der Kornea beschrieben die Sättigung mit THA durchgeführt. Im Anschluß hierzu wurde dieses Gewebe jedoch nicht tiefgefroren, sondern über 15 h bei 4° C in 1.0 ml HClO<sub>4</sub>(0.05 mol.l-1) stengelassen. Im klaren Überstand wurde mittels HPLC der THA-Gehalt bestimmt.

### 3.8.3 Iris-Ziliarkörper

Die THA-Wiederfindungsrate sowie auch die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes im Kaninchen-Iris-Ziliarkörper erfolgten analog den Ausführungen im Kapitel "Kornea".

### 3.8.4 Glaskörper

Zur Ermittlung der Wiederfindungsrate von THA im Glaskörper des Rinderauges wurden 500 µl THA-gesättigter PP pH 4.5 mit demselben Volumen Glaskörper zersetzt. Der Mischung wurden anschließend 1000 µl MTBE zugesetzt und der Ansatz 30 min lang geschüttelt. Die organische Phase wurde mit einer feinen Pipette abgehoben und im Wasserbad zur Trochne eingengt. Der Rückstand wurde schließlich in 1000 µl PP pH 4.5 aufgenommen und durch HPLC der Wirkstoffgehalt bestimmt. Die Bestimmung des THA-Gehalts in den Kaninchen-Glaskörperproben erfolgte in der eben beschriebenen Art und Weise.

### 3.8.5 Sklera

Auch für die Sklera wurde eine Wiederfindungsrate ermittelt. Hierbei wurde ebenfalls wie bei der Konjunktiva eine Sättigung mit THA durchgeführt und anschließend das Gewebe über 15 h bei 4° C in 3.0 ml HClO<sub>4</sub> (0.05 mol.l-1) stengelassen. Der klare Überstand wurde im Anschluß mittels HPLC auf seinen THA-Gehalt überprüft.

### 3.8.6 Plasma

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate im Plasma wurde Rattenplasma verwendet. 400 µl wirkstofffreies Plasma wurde mit 600 µl THA-gesättigtem PP pH 4.5 versetzt und anschließend mit 3.0 ml MTBE überschichtet. Der Ansatz wurde bei 150 Rom 20 min lang geschüttelt und dann bei 4500 Rom 5 min zentrifugiert (Heraeus Medifuge 200S, Hanau). Die Etherphase wurde abgenommen und auf dem Wasserbad eingengt. Der Rückstand wurde in PP pH 4.5 aufgenommen und abschließend der THA-Gehalt ermittelt. Die Aufarbeitung der Kaninchen-Plasmaproben erfolgte in derselben Art und Weise.

Tabelle 5: THA-Wiederfindungsraten bei okularen Geweben des Rinderauges bzw. Rattenplasma (120):

GEWEBE	WIEDERFINDUNGSRATE (%)
Kornea	74.5 ( $\pm$ 15.1)
Konjunktiva	73.3 ( $\pm$ 11.2)
Iris-Ziliarkörper	37.0 ( $\pm$ 2.3)
Glaskörper	38.5 ( $\pm$ 9.5)
Sklera	61.1 ( $\pm$ 9.6)
Plasma	75.4 ( $\pm$ 14.3)

### 3.9 Statistik

Die angegebenen Daten sowie auch die dazugehörigen Symbole stellen die Mittelwerte da. Die Standardabweichung (SD) oder der Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) spiegelt sich in den Fehlerbalken wieder. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede wurde ein zweiseitiger t-Test nach Student mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0.05$ ) verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Bioverfügbarkeit des Thalidomids nach ½-, 1- und 4- stündigem Applikationsintervall

Die Wirkstoffverteilung von Thalidomid-Suspension (THA-SP) und einer THA/HP-β-CD-Lösung (THA-CD) am Kaninchenauge wurde mittels HPLC in den verschiedenen okularen Geweben nach einem Applikationsintervall von 30, 60 und 240 Minuten bestimmt. Die Tabelle 2 zeigt die physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Formulierung.

Tabelle 6: Physikalisch-chemische Parameter der Thalidomid-Augentropfen

	THALIDOMID-HP-β-CYCLODEXTRIN	THALIDOMID-SUSPENSION
Osmolalität [mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	307	293
pH-Wert	4,35	4,43
Dyn. Viskosität η [Mpa·s]	1.4691	1.4647
Dichte ρ [g·cm <sup>-3</sup> ]	1.039	1.005
Brechungsindex	1.350	-
Teilchengröße [μm]	-	< 10

#### 4.1.1 Kammerwasser

Im Kammerwasser wurde mit beiden Präparationen THA-CD und THA-SP ein THA-Gehalt bei einem Applikationsintervall von 30 und 60 Minuten, nicht aber bei einem Applikationsintervall von 240 Minuten nachgewiesen. Der maximale THA-Gehalt für beide Präparationen lag bei 30 Minuten. Es bestand ein signifikanter Unterschied im Wirkstoffspiegel nach 30 und nach 60 Minuten zugunsten der THA-CD-Präparation.

Tabelle 7: Thalidomid-Verteilung im Kammerwasser

	Gehalt [ng ml <sup>-1</sup> ]			Cmax	Tmax	AUC
	30 min	60 min	240 min	[ng ml <sup>-1</sup> ]	Min	[ng min ml <sup>-1</sup> ]
THA-CD	743,89	248,31	0	743.89	30	806.49
SD	(126,92)	(49,57)				
THA-SP	156,39	84,55	0	156.39	30	226.16
SD	(32,20)	(14,97)				
Signifikanz	p<0,05	p<0,05				

SD = Standardabweichung, AUC = area under the curve, Cmax = Konzentrationsmaximum

Tmax = Applikationsintervall mit der höchsten Konzentration

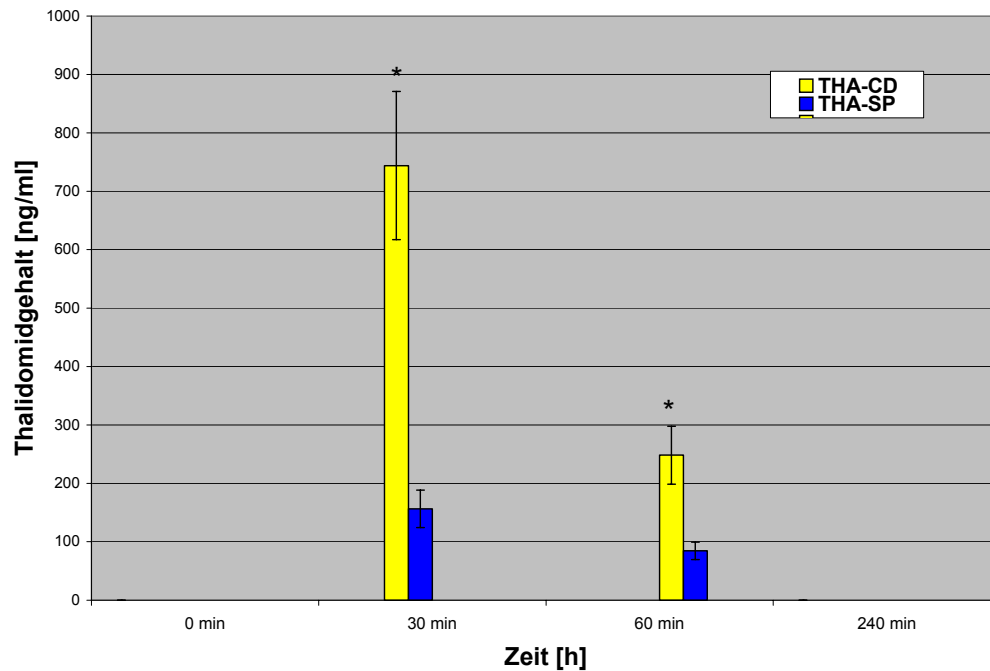


Abbildung 9: Thalidomidspiegel im Kammerwasser des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP) \* Signifikant ( $p < 0,05$ )

#### 4.1.2 Glaskörper

Im Glaskörper wurden mit beiden Präparaten und nach allen Einwirkungszeiten nachweisbare THA-Konzentrationen festgestellt. Der maximale Wirkstoffspiegel wurde allerdings erst nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten erreicht. Nach 30 Minuten finden wir eine höhere Arzneimittelkonzentration bei THA-SP als bei THA-CD. Nach 60 und 240 Minuten finden sich jedoch höhere THA-Konzentrationen mit dem THA-CD-Präparat.

Tabelle 8: Thalidomid-Verteilung im Glaskörper

	GEHALT [NG·ML-1]			CMAX	TMAX	AUC
	30 min	60min	240min	[ng/ml-1]	[min]	[ng·min·m-1]
THA-CD	187,93	1035,05	807,27	1035,05	60	186972,3
SD	(39,90)	(376,61)	(167,79)			
THA-SP	232,41	527,52	493,45	527,52	60	106772,4
SD	(60,44)	(130,59)	(67,14)			
Signifikanz	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$			

(Legende wie bei Tabelle 3)

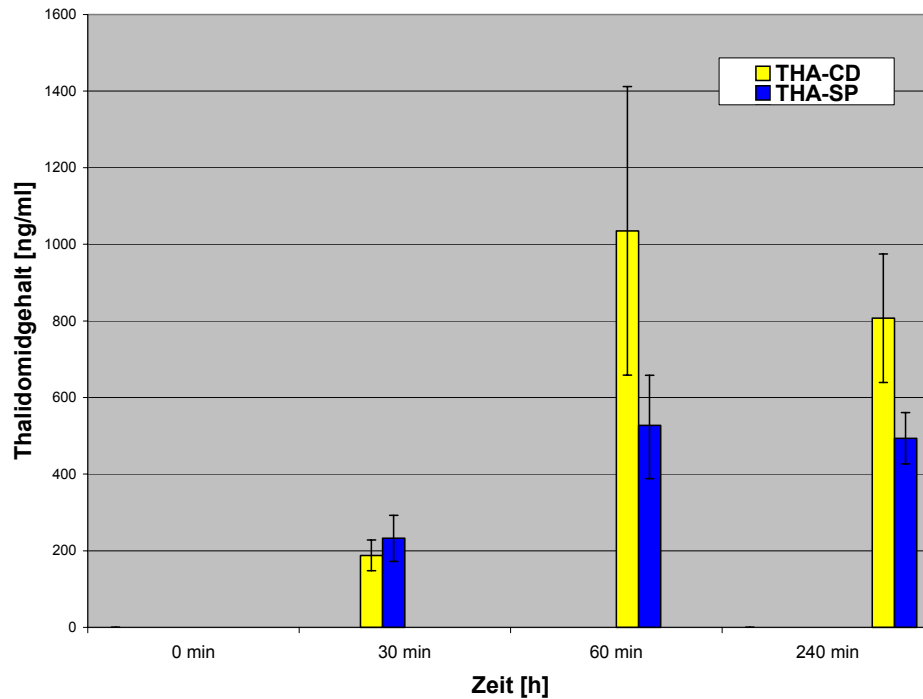


Abbildung 10: Thalidomidspiegel im Glaskörper des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 $\mu$ l Thalidomid-HP- $\beta$ -Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP)

#### 4.1.3 Kornea

Die maximale Arzneimittelkonzentration in der Kornea wurde nach 30 Minuten erreicht, gefolgt von einer raschen Verminderung nach 60 und 240 Minuten. Wie auch beim Glaskörper wurden nach 30 Minuten geringfügig höhere Thalidomid-Konzentrationen mit der THA-SP erreicht.

Tabelle 9: Thalidomid-Verteilung in der Kornea

	Gehalt [ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ] $10^{-6}$			Cmax	tmax	AUC
	30 min	60min	240min	[ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ] $10^{-6}$	[min]	[ $\mu\text{g} \times \text{min} \times \mu\text{g}^{-1}$ ] $10^{-6}$
THA-CD	2,28	0,88	0,58	2,28	30	3,55
SD	(0,35)	(0,44)	(0,39)			
THA-SP	2,56	0,18	0,18	2,56	30	1,87
SD	(0,73)	(0,09)	(0,10)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			

(Legende wie bei Tabelle 3)

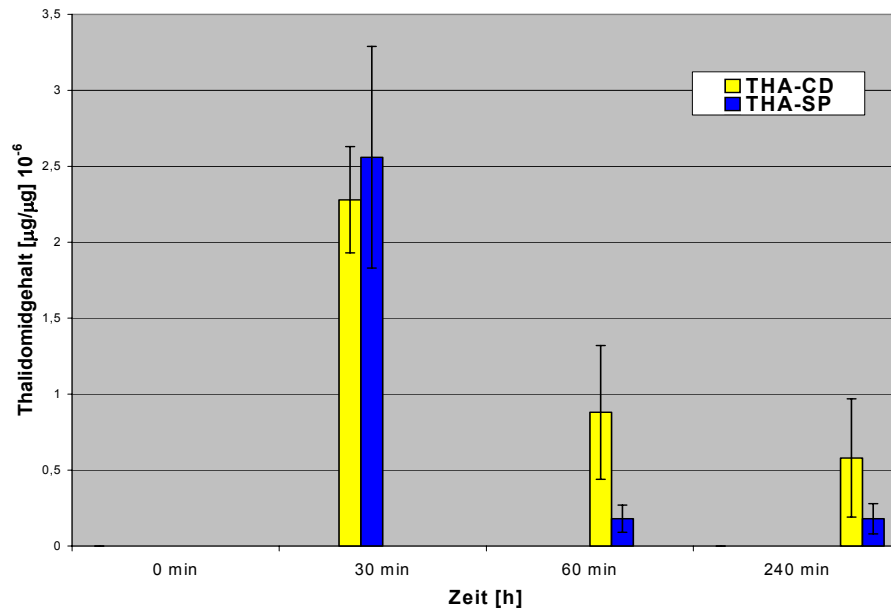


Abbildung 11: Thalidomidspiegel in der Kornea des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 µl Thalidomid-HP-β-Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP)

#### 4.1.4 Konjunktiva

In der Konjunktiva wurde der maximale Wirkstoffspiegel nach 30 Minuten mit dem THA-CD Präparat erreicht. Auch nach 60 und 240 Minuten finden sich noch nachweisbare THA-Konzentrationen mit diesem Präparat. Die THA-Suspension hingegen erreicht das Maximum nach 60 Minuten. Der Wirkstoffspiegel bei der THA-SP erhöht sich bis zum Erreichen des Maximums nur geringfügig und fällt auch danach nur geringfügig wieder ab. Es hat den Anschein, daß die THA-SP-Applikation zu einem konstanten Wirkstoffspiegel in der Konjunktiva führt.

Tabelle 10: Thalidomid-Verteilung in der Konjunktiva

	Gehalt [µg·µg <sup>-1</sup> ]10 <sup>-6</sup>			Cmax	tmax	AUC
	30 min	60min	240min	[µg/µg]10 <sup>-6</sup>	[min]	[µg·min·µg <sup>-1</sup> ]10 <sup>-6</sup>
THA-CD	3,2	1,63	1,28	3,2	30	6,37
SD	(0,59)	(0,44)	(0,23)			
THA-SP	1,65	1,85	1,42	1,85	60	6,19
SD	(0,44)	(0,75)	(0,35)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			

(Legende wie bei Tabelle 3)

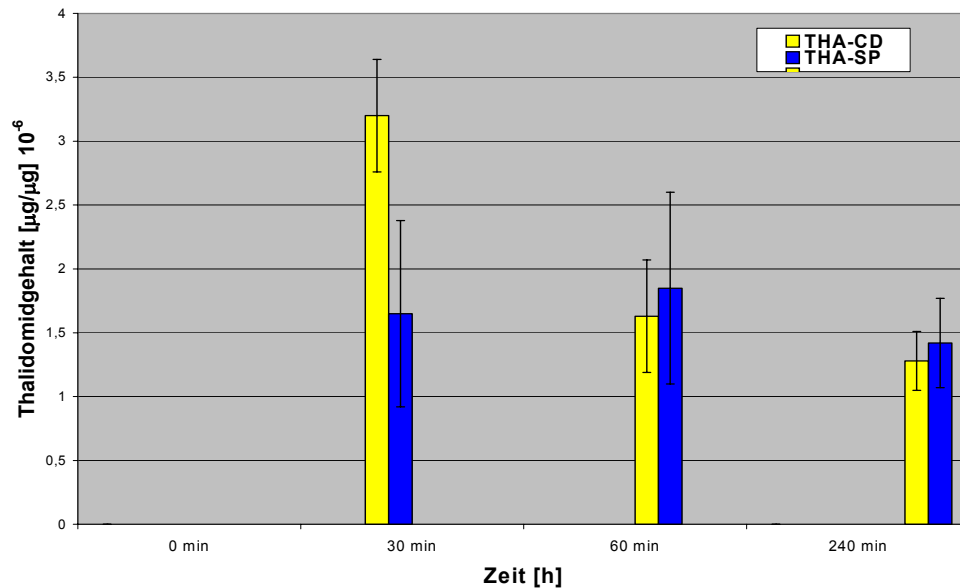


Abbildung 12: Thalidomidspiegel in der Konjunktiva des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 µl Thalidomid-HP-β-Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP)

#### 4.1.5 Sklera

In der Sklera findet sich nach 30 Minuten sowohl bei der THA-CD wie auch bei der THA-SP das Konzentrationsmaximum mit nachfolgend erheblicher Abnahme der Wirkstoffkonzentration. Die höchste Wirkstoffkonzentration wird mit der THA-SP Zubereitung erzielt.

Tabelle 11: Thalidomid-Verteilung in der Sklera

	Gehalt [ $\mu\text{g} \times \mu\text{g}^{-1}$ ] $10^{-6}$			Cmax	tmax	AUC
	30 min	60min	240min	[ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ] $10^{-6}$	[min]	[ $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ] $10^{-6}$
THA-CD	13,35	6,42	3,63	13,35	30	233,6
SD	(4,90)	(2,62)	(0,78)			
THA-SP	30,7	4,58	4,35	30,7	30	298,2
SD	(13,60)	(1,06)	(0,54)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			

(Legende wie bei Tabelle 3)

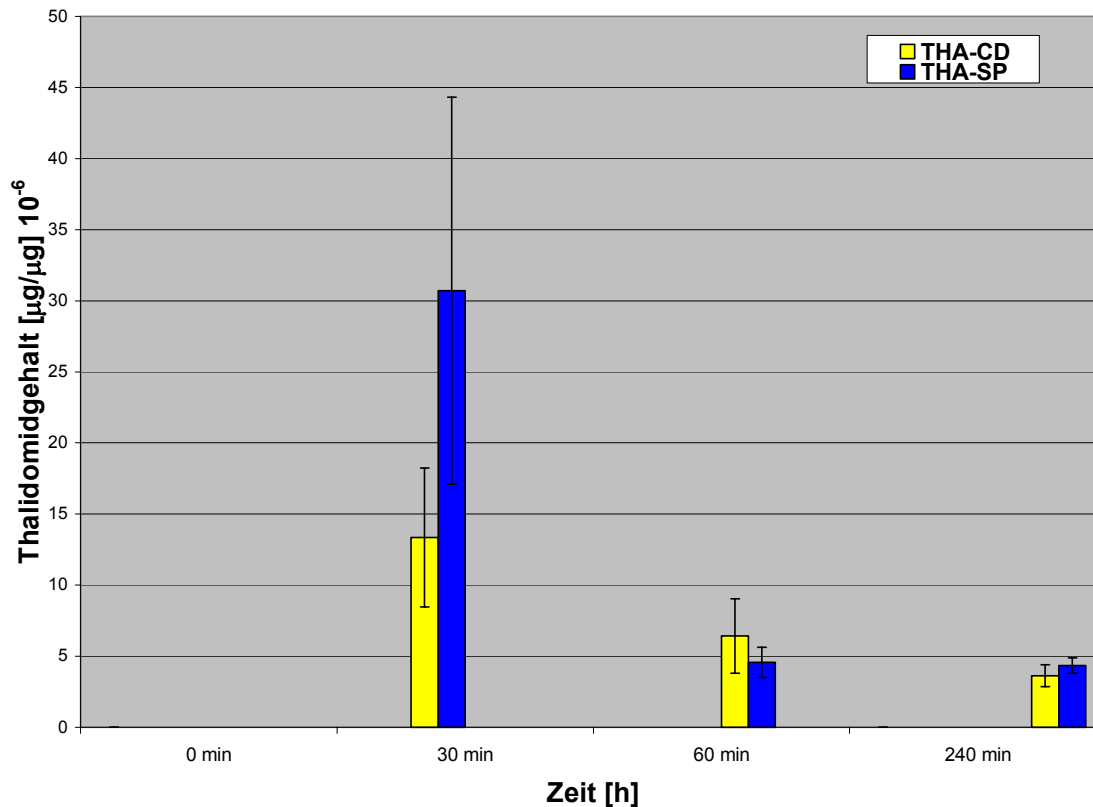


Abb. 12: Thalidomidspiegel in der Sklera des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 µl Thalidomid-HP-β-Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP)

#### 4.1.6 Iris-Ziliarkörper

Im Iris-Ziliarkörper finden sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zubereitungen. Die THA-CD Zubereitung führt zu einem gleichem Wirkstoffspiegel nach 30 und 60 Minuten. Im Kontrast dazu steht die THA-SP Zubereitung, welche nach 60 Minuten sein Konzentrationsmaximum aufweist. Nach 4-stündiger Einwirkzeit sind bei beiden Präparaten nur noch geringfügige Konzentrationen nachweisbar.

Tabelle 12: Thalidomid-Verteilung im Iris-Ziliarkörper

	Gehalt [ $\mu\text{g} \times \mu\text{g}^{-1}$ ] $10^{-6}$			Cmax	tmax	AUC
	30 min	60min	240min	[ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ] $10^{-6}$	[min]	[ $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ] $10^{-6}$
THA-CD	3,1	3,0	1,0	13,1	30	2,82
SD	(0,3)	(0,6)	(0,4)			
THA-SP	2,0	18,2	0,1	18,2	30	32,93
SD	(0,2)	(5,2)	(-)			
Signifikanz	p<0,05	p<0,05	p<0,05			

(Legende wie bei Tabelle 3)



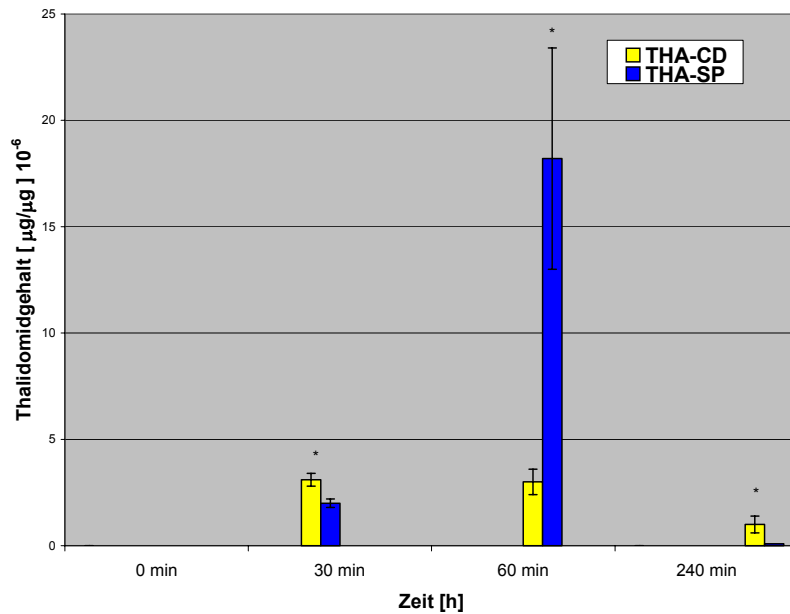


Abbildung 13: Thalidomidspiegel im Iris-Ziliarkörper des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50 µl Thalidomid-HP-β-Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP), \*Signifikant (p<0,05)

#### 4.1.7 Plasma

Zur Abschätzung der systemischen Absorption von Thalidomid wurde an zwei Versuchstieren eine Plasmagehaltsbestimmung durchgeführt. Hierbei wird ersichtlich, daß bei beiden Zubereitungen 30 Minuten nach der Applikation meßbare THA-Konzentrationen vorgefunden wurden. Zur genaueren Charakterisierung der systemischen Absorption von Thalidomid nach topischer Applikation wären weitere Untersuchungen erforderlich.

Tabelle 13: Thalidomid-Verteilung im Plasma

	GEHALT [NG·ML-1]		TMAX
	30 min	60min	[min]
THA-CD	1172,67	67,56	30
THA-SP	804,65	1154,13	60

(tmax Applikationsintervall mit der höchsten Konzentration)

## 4.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse

<b>Flüssige Bestandteile</b>	Gehalt [ng ml <sup>-1</sup> ]			Cmax	Tmax	AUC
	30 min	60 min	240 min	[ng ml <sup>-1</sup> ]	Min	[ng min ml <sup>-1</sup> ]
1. Kammerwasser						
THA-CD	<b>743,89</b>	<b>248,31</b>	0	743.89	30	806.49
SD	<b>(126,92)</b>	<b>(49,57)</b>				
THA-SP	<b>156,39</b>	<b>84,55</b>	0	156.39	30	226.16
SD	<b>(32,20)</b>	<b>(14,97)</b>				
Signifikanz	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>				
2. Glaskörper						
THA-CD	187,93	1035,05	807,27	1035,05	60	186972,3
SD	(39,90)	(376,61)	(167,79)			
THA-SP	232,41	527,52	493,45	527,52	60	106772,4
SD	(60,44)	(130,59)	(67,14)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			
3. Plasma						
THA-CD	1172,67	67,56			30	
THA-SP	804,65	1154,13			60	
<b>Gewebe</b>	Gehalt [µg·µg <sup>-1</sup> ] <sub>10-6</sub>			Cmax	tmax	AUC
	30 min	60min	240min	[µg/µg] <sub>10-6</sub>	[min]	[µg×min×µg <sup>-1</sup> ] <sub>10-6</sub>
1. Kornea						
THA-CD	2,28	0,88	0,58	2,28	30	3,55
SD	(0,35)	(0,44)	(0,39)			
THA-SP	2,56	0,18	0,18	2,56	30	1,87
SD	(0,73)	(0,09)	(0,10)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			
Konjunktiva						
THA-CD	3,2	1,63	1,28	3,2	30	6,37
SD	(0,59)	(0,44)	(0,23)			
THA-SP	1,65	1,85	1,42	1,85	60	6,19
SD	(0,44)	(0,75)	(0,35)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			
Sklera						
THA-CD	13,35	6,42	3,63	13,35	30	233,6
SD	(4,90)	(2,62)	(0,78)			
THA-SP	30,7	4,58	4,35	30,7	30	298,
SD	(13,60)	(1,06)	(0,54)			
Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p>0,05			
Iris-Ziliarkörper						
THA-CD	3,1	3,0	1,0	3,1	30	2,82
SD	(0,3)	(0,6)	(0,4)			
THA-SP	2,0	18,2	0,1	18,2	60	32,93
SD	(0,2)	(5,2)	(-)			
Signifikanz	p<0,05	p<0,05	p<0,05			

SD = Standardabweichung, AUC = area under the curve, Cmax = Konzentrationsmaximum,  
Tmax = Applikationsintervall mit der höchsten Konzentration

Abbildung 14 veranschaulicht den Wirkstoffkonzentrationsvergleich der hydrophilen Augenmedien wie Kammerwasser und Glaskörper. Es ist deutlich zu erkennen, daß die höchsten Wirkstoffkonzentrationen im Kammerwasser und im Glaskörper mit der THA-CD Zubereitung zustande gekommen sind. Dabei ist zu beachten, daß nur der Kammerwasserspiegel einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Präparationen darstellt.

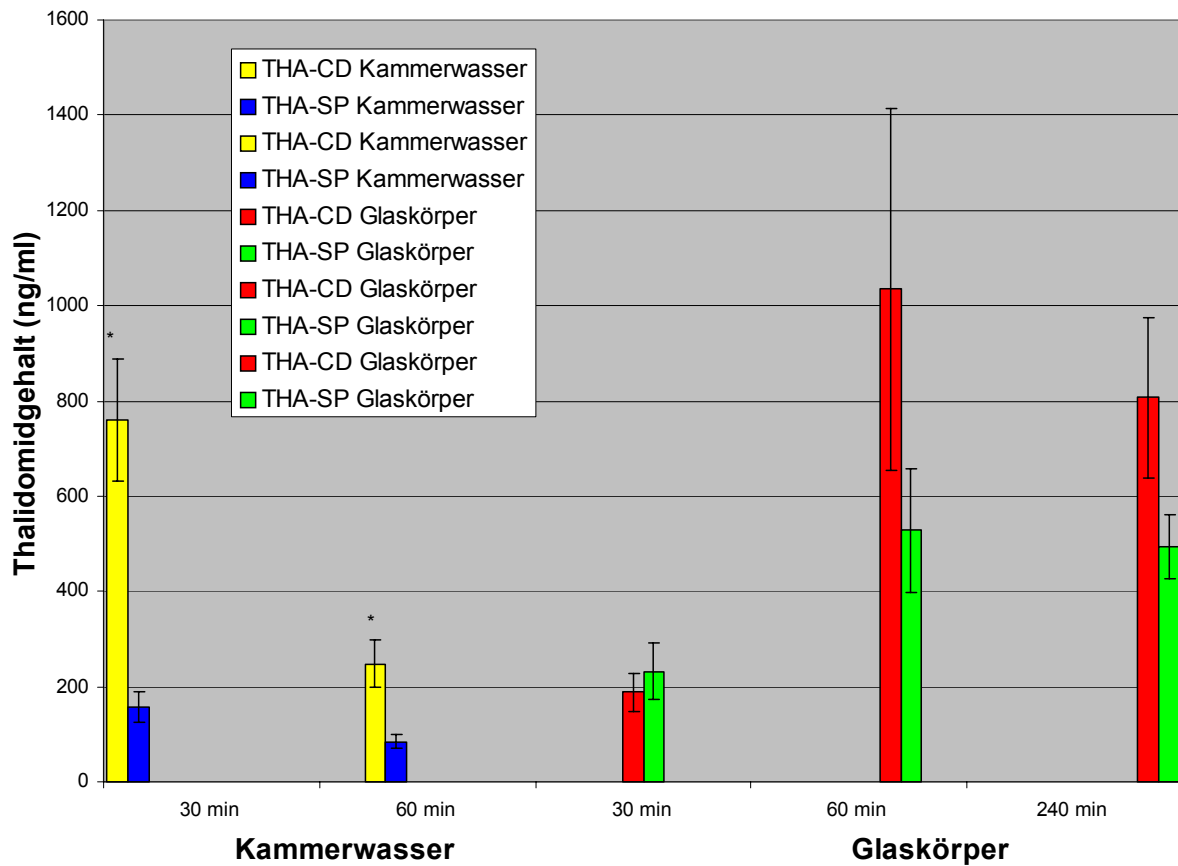


Abbildung 14: Thalidomidspiegel im Kammerwasser und Glaskörper des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50µl Thalidomid-HP-β-Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP), \*Signifikant (P<0,05), SD= Standardabweichung (121)

Abbildung 15 soll die unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen in den Augengeweben mit den jeweiligen Zubereitungsformen nach 30, 60 und 240 Minuten veranschaulichen. Erhebliche Wirkstoffkonzentrationen lassen sich nur in der Sklera und im Iris-Ziliarkörper nachweisen. Bei der Gegenüberstellung der beiden Zubereitungsformen (THA-CD und THA-SP) ist zu beachten, daß lediglich der Iris-Ziliarkörper einen signifikant unterschiedlichen Konzentrationsspiegel aufweist. Die Kornea und die Konjunktiva zeigen mit beiden Zubereitungen keinen signifikanten Unterschied in der Wirkstoffkonzentration.

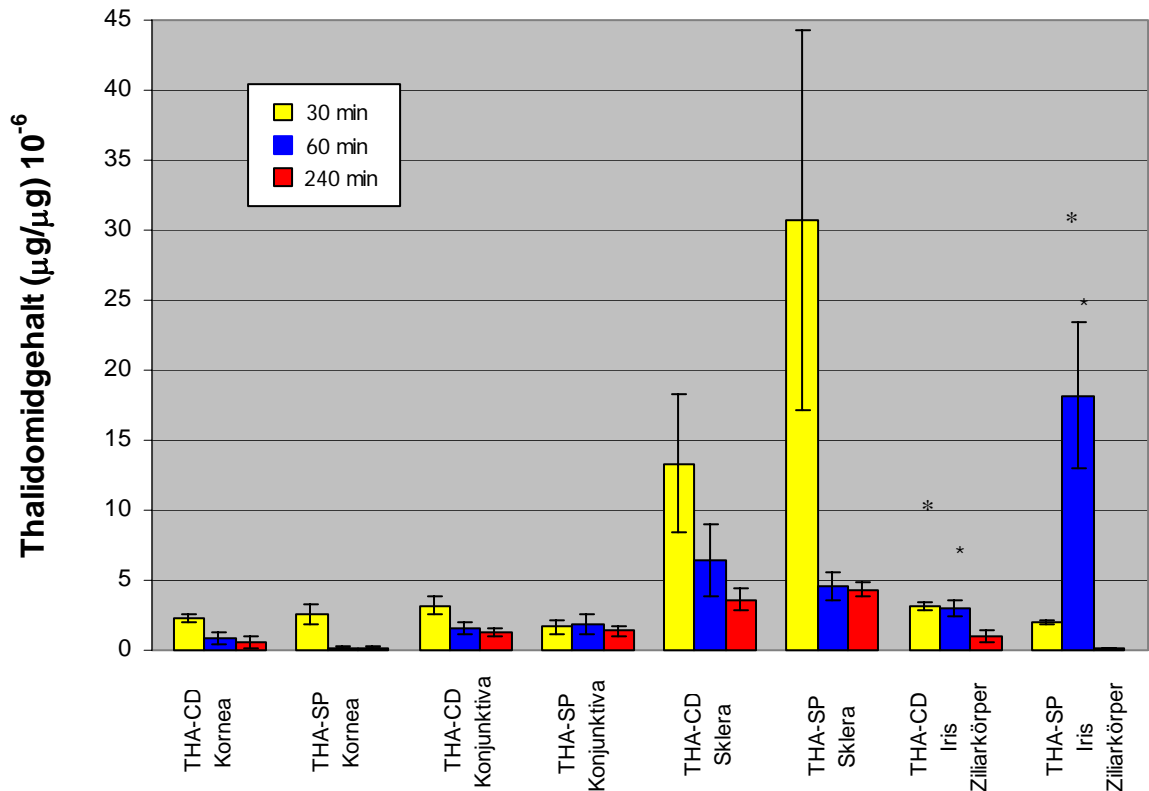


Abbildung 15: Thalidomidspiegel in den Augengeweben des Kaninchenauges nach Applikation von 5 x 50µl Thalidomid-HP-β-Cyclodextrin (THA-CD) bzw. Thalidomid-Suspension (THA-SP), Signifikant ( $P \geq 0,05$ ) (121)

## DISKUSSION

Thalidomid wurde 1961 wegen seiner Teratogenität vom Markt genommen. In den letzten Jahren erfuhr Thalidomid auf Grund seiner antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und antiangiogenetischen Eigenschaften verstärkte Aufmerksamkeit. Krankheiten wie die Lepra lepromatosa, therapierefraktäre Dermatosen (41,66,117-118), Aphten bei Behçet-Krankheit (23,27,38,48-49,126,150-152,155), Ulzera bei AIDS-Patienten (3,57-59,105,154), HIV wasting (42-43,76-77,85,103,115), und multiples Myelom (5,21,47,81,100,104,117,125,140) können mit Thalidomid behandelt werden.

Die antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und antiangiogenetischen Eigenschaften des Thalidomids sind in der Augenheilkunde sehr erwünscht. Bei klinischen und experimentellen ophthalmologischen Erkrankungen, die durch Gefäßproliferation gekennzeichnet sind, wie die diabetische Retinopathie und die altersbedingte Makuladegeneration (33) oder immunpathologische Erkrankungen wie die Uveitis (44) hat Thalidomid einen günstigen Effekt gezeigt.

Die systemische Applikation von Thalidomid, intravenös oder parenteral, hat aufgrund der hohen erforderlichen Dosis zur Überwindung der Blut-Netzhaut- und Blut-Kammerwasser-Schranke, den Nachteil systemischer Nebenwirkungen. Thalidomid kann zu schwerster Obstipation, Schwindel, Kater, Gedächtnisverlust, Hypotension, irreversibler Neuropathie, und nach längerem Gebrauch zu Hypothyreoidismus führen (1). Darüber hinaus ist Thalidomid wie schon oben erwähnt teratogen. Daher ist die systemische Thalidomidapplikation zur Therapie von Augenerkrankungen nicht geeignet.

Zur Überwindung der systemischen Limitationen können in Einzelfällen intravitreale Injektionen eingesetzt werden, die ihrerseits zu Endophthalmitis und Netzhautablösungen führen können.

Die topische Anwendung von Pharmaka am Auge ist limitiert durch die gering erreichbare intraokulare Bioverfügbarkeit. Die lange Diffusionsstrecke, schnelle präkorneale Medikamentenelimination und geringe korneale Permeabilität sind die limitierenden Faktoren zum Erreichen eines effektiven intraokularen Wirkstoffspiegels. Nach der Gabe von Augentropfen beim Kaninchen liegt der intraokular nachweisbare Anteil des Wirkstoffes typischerweise unter 5% und ist beim Menschen ähnlich oder geringer (82,86,112). Darüber hinaus sind bei der spezifischen Anwendung von Thalidomid seine schlechte Löslichkeit (50µg/ml) (78), rasche hydrolytische Degeneration und geringe Korneapenetration weitere limitierende Faktoren zur Erreichung eines effektiven Wirkspiegels im Auge.

**Von der Thalidomidtherapie ist daher das Erreichen eines hohen Wirkstoffspiegels am Wirkort bei geringen systemischen Nebenwirkungen zu fordern.**

Die Aufnahme eines Wirkstoffs in den Körper bestimmt maßgeblich seine Pharmakokinetik. Die Pharmakokinetik beschreibt die Absorption, Distribution und Elimination eines Medikamentes im Körper. Unter Absorption versteht man in der Augenheilkunde, die Aufnahme von Medikamenten z.B. ins Kammerwasser. Unter Distribution versteht man die Verteilung des Medikamentes vom Kammerwasser zu peripheren Geweben wie Konjunktiva, Kornea, Linse, Iris-Ziliarkörper, Aderhaut und Glaskörper. Als Elimination bezeichnet man die Abnahme der Medikamentenkonzentration im Auge durch Metabolisierung oder Abtransport über die Blut-Kammerwasser-Schranke in die systemische Zirkulation. Bioverfügbarkeit kennzeichnet die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Absorption. Sie wird bestimmt durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Medikamentes, den okularen Penetrationsbarrieren und ist abhängig von präkornealen Faktoren wie Tränenflüssigkeit, Tränenabfluß und Lidaktion (113).

Ansatzpunkte zur Erhöhung der intraokularen Bioverfügbarkeit bei der topischen Applikation bestehen in der Wirkstoffkonzentrationserhöhung, der Verlängerung der Verweildauer sowie der Unterbrechung der kornealen Epithelbarriere durch Konservierungsstoffe wie z. B. Benzalkoniumchlorid. Die Verweildauer kann durch Substanzen wie Methylcellulose, die die Viskosität erhöhen, verbessert werden. Andere Methoden zur Verlängerung der Verweildauer sind Inserts, Gele, weiche Kontaktlinsen, Liposomen (148), mit den Wirkstoffen getränkte Kollagenlinsen (34,98) oder der Verschuß des Tränenpunktes (32). Eine weitere Methode zur Verlängerung der Verweildauer bieten die Cyclodextrine, die die Bioverfügbarkeit weder durch Zerstörung der kornealen Epithelbarriere noch durch Viskositätserhöhung steigern, sondern durch Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs bewirken.

**Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der möglichen Verbesserung der intraokularen**

### **Bioverfügbarkeit von Thalidomid durch den Zusatz von Cyclodextrinen bei der topischen Applikation.**

Der Aufbau der Cyclodextrine, speziell die Anordnung der Glukoseeinheiten, ist dafür verantwortlich, daß das Molekül auf der Außenseite hydrophil und auf der Innenseite hydrophob ist. Dies gibt der Substanz die Möglichkeit, Einschlußkomplexe mit apolaren Substanzen zu bilden (73,78). Diese Einschlußkomplexe erhöhen die Löslichkeit und Stabilität des in ihnen enthaltenen Medikamentes (141). Cyclodextrine werden durch die Anzahl der in ihnen enthaltenden Glukoseeinheiten und damit der Größe ihres Innendurchmessers von einander abgegrenzt. Der Innendurchmesser ist entscheidend für die Größe der aufnehmbaren Substanz. Wir haben in dieser Studie HP- $\beta$ -CD verwendet, weil sein 0,78 nm großer Innendurchmesser sich gut zur Aufnahme des 0,7 nm großen Thalidomidmoleküls eignet (73). Die Verbindung des Thalidomids mit HP- $\beta$ -CD steigert die Löslichkeit ( $>45\text{g}/100\text{ml}$ ) des Thalidomids auf das 30-fache gegenüber der Kombination mit anderen Cyclodextrinen (73,78). Der Zusatz von HP- $\beta$ -CD führt zu einer Löslichkeitsverbesserung des Thalidomids von  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  auf  $1,7\text{mg}/\text{ml}$  (78). Zusätzlich zeigt die Komplexierung des Thalidomids mit HP- $\beta$ -CD einen Schutz vor raschem Abbau, was sich an der Halbwertszeitverlängerung von 2,1 auf 4,1 Stunden zeigt (78).

#### **1. Besteht eine Verbesserung der Löslichkeit des Thalidomids durch den Zusatz von Cyclodextrinen und damit eine erhöhte intraokulare Verfügbarkeit?**

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß der Zusatz von  $\beta$ -CD zu einer signifikanten Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Thalidomids führt. Die Bioverfügbarkeit, die durch die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Absorption eines Wirkstoffs ins Kammerwasser gekennzeichnet ist beträgt bei der THA-CD Formulierung nach 30 Minuten  $743,89\text{ ng ml}^{-1}$  im Vergleich zu  $156,39\text{ ng ml}^{-1}$  bei der THA-SP. Nach 60 Minuten beträgt der THA-Gehalt bei der THA-CD Formulierung  $248,31\text{ ng ml}^{-1}$  im Vergleich zu  $84,55\text{ ng ml}^{-1}$  bei der THA-SP Formulierung. Dieses Ergebnis zeigt, daß HP- $\beta$ -CD das Ausmaß der Absorption erhöht und die Aufnahme beschleunigt. Dies wird deutlich durch die 7-fache Erhöhung der Bioverfügbarkeit nach 30 Minuten im Vergleich zur 3-fachen Erhöhung nach 60 Minuten. Nach 240 Minuten ist bei beiden Formulierungen kein THA Gehalt mehr nachweisbar.

Es scheint, daß HP- $\beta$ -CD zwar die Absorption des Thalidomids verbessert, aber keinen Einfluß auf die Elimination hat. Der hydrophile Charakter der CD läßt die Annahme zu, daß reine CD nicht durch die Kornea transportiert werden (142). Entsprechend ist zu vermuten, daß Thalidomid-CD-Komplexe ebenfalls nicht effektiv die Kornea penetrieren können und somit die Komplexdissoziation vielmehr im präkornealen Tränenfilm abläuft. Daraus folgt weiterhin, daß kein intraokularer Einfluß des HP- $\beta$ -CD auf die Distribution oder Elimination des Thalidomids besteht. Wir nehmen an, daß im präkornealen Tränenfilm die eingeschlossene Substanz langsam aus dem Cyclodextrin freigesetzt wird und es dadurch zu einer „Depotwirkung“ kommt. Ähnliches wird auch bei der Anwendung von Kollagenlinsen als Medikamententräger berichtet (98).

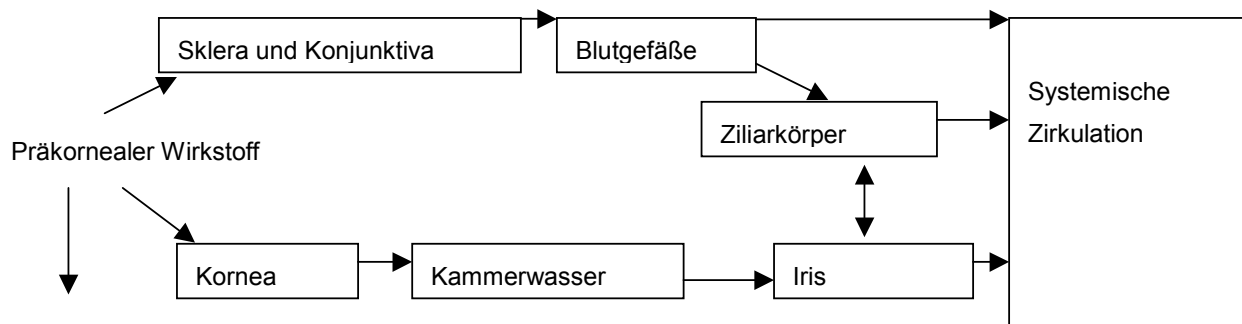
Die längere Verweildauer des Thalidomidmoleküls im Tränenfilm wäre eine Möglichkeit, die erhöhte intraokulare Bioverfügbarkeit durch den Zusatz von Cyclodextrinen zu erklären. Weitere Hypothesen wären eine Veränderung der kornealen Permeabilität, oder ein erhöhter Anteil an gelösten Feststoffpartikeln im Tränenfilm.

#### **2. Wie verteilt sich das Thalidomid im Kaninchenauge nach der Applikation einer cyclodextrinhaltigen Lösung im Vergleich zur Suspension?**

Die meisten topisch applizierten Medikamente können auf kornealem, konjunktivalem oder über die systemische Zirkulation die okularen und intraokularen Gewebe und Flüssigkeiten erreichen (111).

Da die Kornea insbesondere für hydrophile Medikamente eine starke Penetrationsbarriere darstellt, ist anzunehmen, daß hydrophile Medikamente durch andere Penetrationswege die intraokularen Gewebe erreichen. Eine Serie von Versuchen hat gezeigt, daß die äußerste Schicht der Sklera eine weit geringere Penetrationsbarriere für hydrophile Medikamente darstellt als das Epithel der Kornea (1,24,147). Auch

besitzt die Sklera Gefäße, die mit der Uvea in Verbindung stehen, über welche die Aufnahme von Medikamenten erfolgen könnte. Die folgende Abbildung zeigt verschiedene Wege der Wirkstoffaufnahme.



Drainage und anderer Wirkstoffverlust

Abbildung 16: Flußdiagramm zur Beschreibung der okularen Aufnahme eines präkorneal applizierten Wirkstoffs; korneale und konjunktival-sklerale Route nach Schoenwald (110)

Die Abbildung zeigt, daß lokal applizierte Augenmedikamente auf kornealem und/oder auf konjunktival-skleralem Weg absorbiert werden können. Die Ergebnisse unserer Studie, die eine erhöhte Kammerwasserkonzentration bei der THA-CD-Zubereitung und eine erhöhte Iris-Ziliarkörper-Konzentration bei der THA-SP-Zubereitung gezeigt haben, erlauben die Annahme, daß die verschiedenen Zubereitungen unterschiedlich aufgenommen werden. Die folgende Abbildung zeigt den vermuteten Aufnahmeweg des THA-CD-Komplexes und der THA-SP.

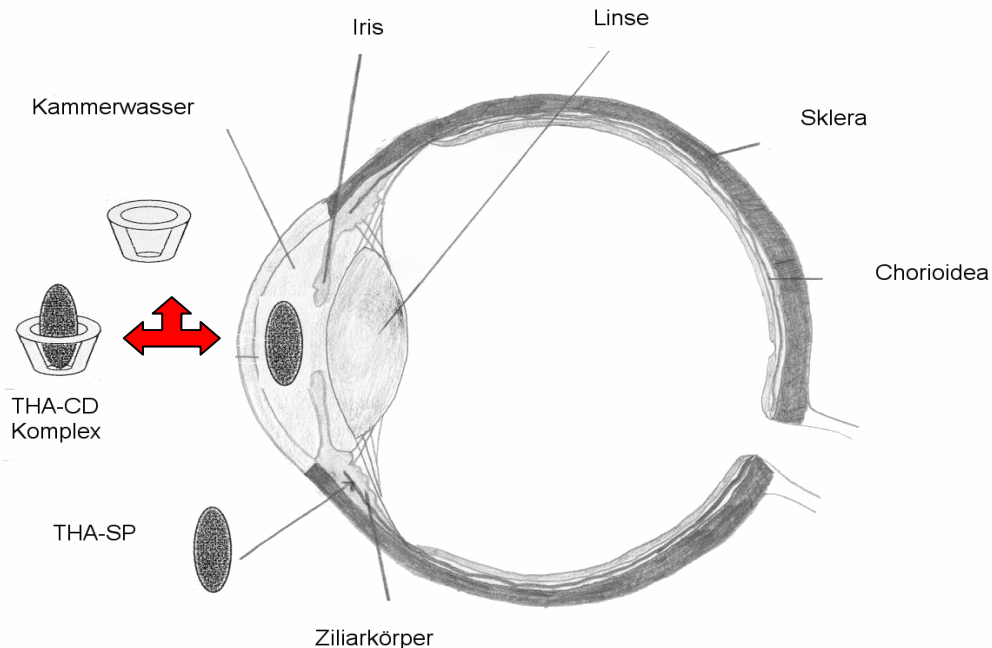


Abbildung 17: Okulare Aufnahme eines präkorneal applizierten Wirkstoffs; korneale und konjunktival-sklerale Route modifiziert nach Schoenwald (110)

Es kann angenommen werden, daß im Falle der THA-Suspension die okulare Aufnahme auf dem konjunktival-skleralen Weg und im Falle der THA-CD Zubereitung eher auf dem kornealen Weg erfolgt.

Die Umgehung der vorderen Augenkammer bei der THA-SP Zubereitung würde sowohl den erniedrigten Kammerwasserkonzentrationspiegel als auch die erhöhte Iris-Ziliarkörper-Konzentration erklären. Der konjunktival-sklerale Aufnahmeweg wird auch für andere Stoffe wie Timolol (24,95), Inulin (24,95), Gentamicin (13) oder bestimmte Carboanhydrasehemmer (25) beschrieben.

Ob die okulare Aufnahme eines Pharmakons eher über den konjunktival-skleralen oder den kornealen Weg erfolgt, ist abhängig vom pH-Wert der Lösung, der Ladung, der Molekülgröße, der Viskosität der Lösung und vor allem der Hydrophilie bzw. Lipophilie der Substanz (12). Lipophile Medikamente erreichen die intraokularen Strukturen zu einem größeren Ausmaß transkorneal, während hydrophile Medikamente eher über den konjunktival-skleralen Aufnahmeweg in das Auge gelangen (12).

Eine Studie von Ahmed und Patton (2) hat den nichtkornealen Aufnahmeweg von Inulin und Timolol unter Verwendung eines zylindrischen Aufsatzes auf der Kornea untersucht. Zusätzlich wurde auch die intraokularen Konzentrationen, zum Ausschluß einer systemischen Resorption, nach einer unilateralen Applikation und nach einer i.v. Dosis bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß die höchsten Konzentrationen gemessen wurden, wenn der korneale Aufnahmeweg nicht blockiert war, dennoch konnten im Iris-Ziliarkörper, in der Linse und im Glaskörper bei blockierter Kornea erhebliche Wirkstoffkonzentrationen nachgewiesen werden. Die auf dem nichtkornealen Aufnahmeweg erreichten Wirkstoffkonzentrationen im Iris-Ziliarkörper und im Glaskörper betrugen 70-80% der gesamten Wirkstoffkonzentrationen (kornealer und nichtkornealer Aufnahmeweg). Bei einseitiger Applikation zeigte sich im kontralateralen, unbehandelten Auge eine Konzentration von <1% der erzielten Wirkstoffkonzentration des behandelten Auges. Bei systemischer (i.v.) Applikation zeigten sich <5% der erreichten Wirkstoffkonzentration nach topischer Applikation. Diese Ergebnisse haben gezeigt, daß die systemische Reabsorption nicht die ermittelten intraokularen Konzentrationen erklären kann.

Penetrationsversuche von Doane (24) mit Pilocarpin und Hydrokortison haben ebenfalls den kornealen und den nichtkornealen Aufnahmewege untersucht und hierbei hat sich gezeigt, daß Pilocarpin und Hydrokortison auf konjunktival-skleralem und kornealem Aufnahmeweg die intraokularen Gewebe erreichen. Bei diesen Versuchen wurden drei verschiedene Applikationsarten von Pilocarpin und Hydrokortison unterschieden. In Gruppe A hatten die Medikamente Zugang zu Konjunktiva, Sklera und Kornea; in Gruppe B wurde unter Benutzung einer Penetrationsbarriere in Form eines zylinderförmigen Aufsatzes der Kontakt zur Kornea verhindert; in der Gruppe C wurde der Kontakt zur Kornea verhindert und zusätzlich die Konjunktiva entfernt. Diese Versuche zeigten, daß die höchsten intraokularen Medikamentenkonzentrationen dann gefunden wurden, wenn die Medikamente Zugang zu Kornea und Konjunktiva hatten. Bei Hydrokortison-Acetat ließ sich auf dem kornealem im Vergleich zum konjunktival-skleralem Aufnahmeweg eine 70-fach höhere Medikamentenkonzentration in der Kornea und eine 40-fach höhere Medikamentenkonzentration in der Iris nachweisen. Ähnliches gilt für Pilocarpin. Wenn man die Medikamentenkonzentration von Iris und Ziliarkörper bei kornealem vs. extrakornealem Aufnahmeweg vergleicht, ergibt sich für Pilocarpin ein Konzentrationsfaktor von 5:1. Bei diesen Penetrationsversuchen hat die Entfernung der Konjunktiva zu keinem signifikanten Konzentrationsunterschied geführt. In unseren Versuchen haben wir auch keine signifikanten Wirkstoffkonzentrationsunterschiede in der Konjunktiva bei beiden Präparationen feststellen können. Dies läßt vermuten, daß die Konjunktiva für die intraokulare Aufnahme von topisch applizierten Augenmedikamenten von untergeordneter Bedeutung ist.

Wenn der korneale Zugang nicht blockiert ist, gelangen Augentropfen in zwei Phasen durch den vorderen Augenabschnitt: in der Penetrationsphase werden die Augentropfen in die Kornea aufgenommen, in der Auswaschphase wieder aus der Kornea eliminiert. Der Anteil der Substanz, der während der Penetrationsphase in die Kornea aufgenommen wird, ist abhängig von der Dynamik des Tränensystems, von der Permeabilität des Korneaepithels sowie von der Kontaktzeit. Die maximale Substanzkonzentration in der Kornea wird schon nach wenigen Minuten erreicht. Von dort penetriert die Substanz weiter in die vordere Augenkammer. Die Geschwindigkeit, mit der die Substanz das Kammerwasser erreicht, ist abhängig von der Permeabilität des Kornea-Endothels. Bei niedriger Endothelpermeabilität kann es bis zu 2 Stunden dauern, bis die maximale Kammerwasserkonzentration erreicht wird (88). Auf der anderen Seite kann bei hoher Endothelpermeabilität schon nach 10-20 Minuten die maximale Kammerwasserkonzentration erreicht sein (88). In der Auswaschphase fungiert die Kornea als Medikamentenreservoir. Sie gibt das Medikament langsam wieder ab und bestimmt so, wie schnell die Konzentration im Auge wieder abfällt.

Wenn der korneale Zugang blockiert ist, müssen topisch applizierte Augenmedikamente, die durch die Sklera aufgenommen werden, durch lange Diffusionswege die anderen intraokularen Strukturen erreichen. Die benötigte Zeitdauer für diese Diffusion könnte im Falle der THA-SP eine Erklärung für die



anfänglich (nach 30 Minuten) sehr niedrige Iris-Ziliarkörper-Konzentration von  $2,0 [\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}] 10^{-6}$ , im Vergleich zu der maximalen Iris-Ziliarkörper-Konzentration von  $18,2 [\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}] 10^{-6}$  nach 60 Minuten sein. Hierfür würde auch die anfänglich (nach 30 Minuten) 7-fach niedrigere Kammerwasserkonzentration bei der THA-SP Formulierung im Vergleich zu der nur 3-fach niedrigeren Kammerwasserkonzentration nach 60 Minuten sprechen. Die endgültig erreichte geringere Kammerwasserkonzentration bei THA-SP Formulierung könnte bei diesem Aufnahmeweg durch Blutzirkulationsverluste bedingt sein, bevor der Wirkstoff per diffusionem die anderen Augenabschnitte erreicht. Versuche an toten Tieren ergaben eine 5-10-fach höhere Medikamentenkonzentration im Vergleich zu lebenden Tieren, was diese Vermutung unterstützt (24).

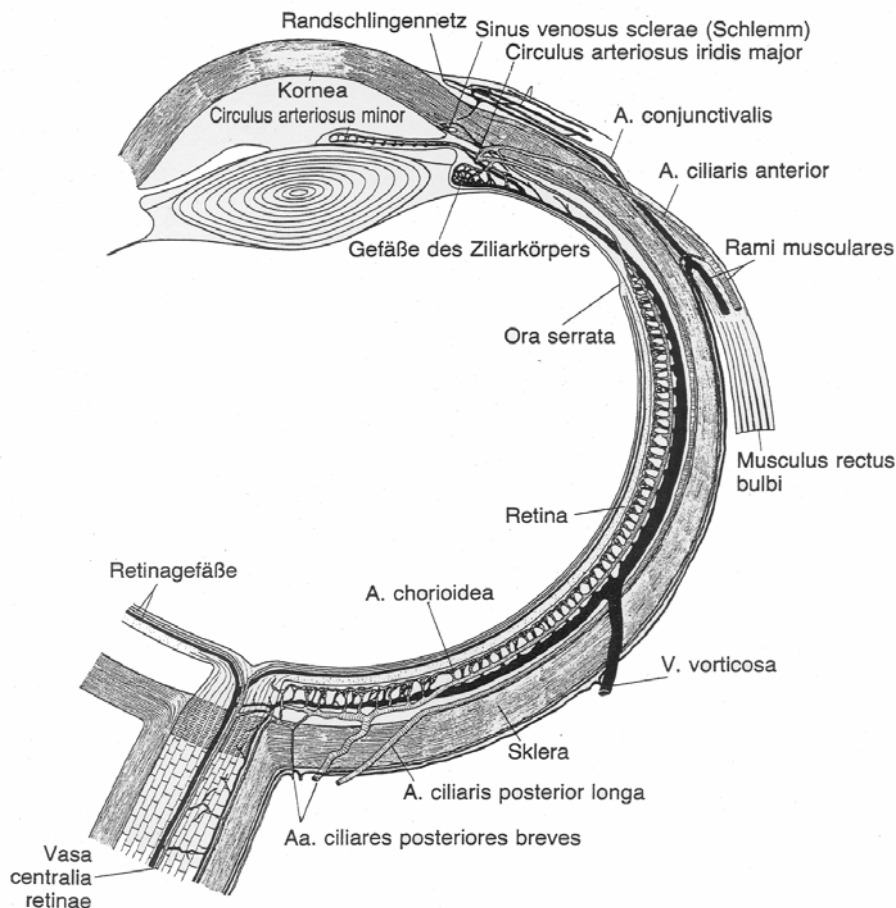


Abbildung 18: Schema der Blutgefäße des Auges (aus 54)

Ebenfalls ist es möglich, daß die intraokular erreichten Wirkstoffkonzentrationen zum Teil aus einer systemischen Reabsorption stammen. Diesbezüglich wurden bei unseren Untersuchungen orientierende Plasmaentnahmen an 2 Versuchstieren durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei der THA-CD Formulierung ein Plasma-THA-Gehalt von  $1172,67 \text{ ng ml}^{-1}$  im Vergleich zu  $804,65 \text{ ng ml}^{-1}$  bei der THA-SP Formulierung nach 30 Minuten, und nach 60 Minuten bei der THA-CD Formulierung  $67,56 \text{ ng ml}^{-1}$  im Vergleich zu  $1154,13 \text{ ng ml}^{-1}$  bei der THA-SP Formulierung.

Es ist bis heute nicht bekannt, wie topisch applizierte Medikamente die hinteren Augenabschnitte (Glaskörper, Retina, Nervus opticus) erreichen. Plausible Routen wären die transkorneale Absorption mit anschließender Diffusion, die systemische Absorption und okuläre Reabsorption (132), oder die transsklerale Absorption. Eine pharmakokinetische Studie mit topischer, subkonjunktivaler und systemischer Applikation von NSAID's, ergab hohe Medikamentenkonzentrationen im vorderen Augensegment und nicht signifikante Konzentrationen im hinteren Augensegment bei der topischen Applikation (144), was eher gegen die transkorneale Absorption mit anschließender Diffusion spricht. Im Gegensatz hierzu, haben mehrere Studien bei einer unilateralen Applikation von Augenmedikamenten meßbare Konzentrationen im kontralateralen Auge festgestellt, welche für die systemische Reabsorption,

vor allem im hinteren Augensegment sprechen würden. Es existieren einige Theorien zu diesem kontralateralen Effekt, wovon die verbreitetste und akzeptierteste eine systemische Absorption über die Konjunktiva und Mukosa des Tränennasenkanals und vaskulärem Transport in das kontralaterale Auge ist (74). Eine klinische Studie von Saari (107) mit 57 Patienten zur okularen und systemischen Absorption von einseitig topisch applizierten 40 µl einer 0,5 % Timolollösung, stellte eine Kammerwasserkonzentration von  $1,9 \pm 0,8$  µg/ml nach einem Applikationsintervall von 74 min. im **behandelten** Auge, einer maximalen Plasmakonzentration von  $1,69 \pm 0,89$  ng/ml nach  $22 \pm 26$  min. (1000x niedriger als im Kammerwasser), und ebenfalls eine Kammerwasserkonzentration von 0,04-0,3 ng/ml nach einem Applikationsintervall von 134 min bei 42% der **unbehandelten** Augen fest (1/500–1/50000 x niedriger als im behandelten Auge). Eine Studie von Acheampong (1) zeigte bei einer unilateralen Applikation von 0,2% (50µl) Cyclosporin A Emulsion eine messbare Menge an Radioaktivität im unbehandelten Auge. Die messbare Radioaktivität im unbehandelten Auge betrug in den meisten Geweben unter 5% der gemessenen Menge im behandelten Auge. Auffallend war hierbei eine erhebliche Radioaktivität in Linse, Choroidea-Retina, Glaskörper, Tränendrüse und Nervus optikus im unbehandelten Auge die zwischen 11-87% betrug (1). Eine Studie an Long-Evans Ratten von Alexander (132) zeigte bei der unilateralen topischen Applikation von Timolol hohe Wirkstoffkonzentration in der Iris des unbehandelten Auges, was vermuten läßt, daß diese Konzentration durch eine systemische Route erreicht werden. (132). Es ist also durchaus vorstellbar, daß die von uns festgestellte intraokulare Thalidomid-Konzentration zum Teil durch Diffusion (transkorneal und subkonjunktival) aber auch, speziell im hinteren Augensegment, durch systemische Reabsorption zustande gekommen sind.

Bei unserer experimentellen Arbeit wurden insgesamt 2 Gruppen von je 9 Versuchstieren mit 2 verschiedenen Darreichungsformen (THA-CD oder THA-Suspension) behandelt. Danach wurden von jeder Gruppe 3 Tiere nach einem bestimmten Zeitintervall getötet (30 min, 60 min, 4 Std.) und der Thalidomidgehalt mittels HPLC bestimmt. Problematisch ist, daß es sich hierbei um eine relativ geringe Anzahl an Versuchstieren handelt, weshalb eine statistische Unschärfe angemerkt werden muss. Andererseits ist die Durchführung von Tierversuchen zunehmend problematisch und Thema ethischer Diskussionen, so daß für die Gewinnung erster Erkenntnisse eine höhere Anzahl an Versuchstieren nicht bewilligt wurden.

Es hat sich herausgestellt, daß eine einseitige topische Applikation und eine systemische Applikation mit einer beidseitigen intraokularen THA-Gehaltsbestimmung und einer Plasmabestimmung an allen Kaninchen sinnvoll gewesen wäre, um ein genaueres Maß der systemischen Absorption und der eventuellen systemischen Reabsorption nachzuweisen. Hierfür wäre jedoch eine größere Anzahl an Versuchstieren unerlässlich gewesen.

Eine Folgestudie mit einer unilateralen Applikation, gefolgt von einer bilateralen Thalidomid-Gehaltsbestimmung könnte eine systemische Reabsorption nachweisen und gegebenenfalls quantifizieren. Eine okuläre Penetrationsstudie mit einer unilateral applizierten Dosis von 10 µl  $\Delta$ tetrahydrocannabinol (40) sowie auch andere Studien konnten jedoch keine Medikamentenkonzentration im kontralateralen Auge dokumentieren. Ebenfalls wäre eine systemische (i.v.) Applikation mit einer anschließenden Bestimmung der intraokularen Konzentrationen sehr aufschlußreich.

Bemerkenswert war eine Studie von Koevary (74) zur topischen Applikation von Insulin an Ratten. Diese zeigte eine Anreicherung des Insulins in der behandelten Retina, sowie eine verzögerte und geringere Anreicherung in der Retina und im Kammerwasser des kontralateralen Auges. Interessanterweise zeigte sich bei diesen Untersuchungen auch bei toten Tieren eine Insulinanreicherung im kontralateralen Auge, welches die direkte Rolle der systemischen Zirkulation als Aufnahmeweg ausschließt (74). Diese Studie postuliert eine mögliche Aufnahme über den Liquor und die den Nervus opticus umgebenden Meningen (74).

### 3. Eignet sich Thalidomid zur Formulierung wässriger Augentropfen?

Das wesentliche Ergebnis dieser Studie besteht darin nachgewiesen zu haben, daß die Komplexbildung des Thalidomids mit HP- $\beta$ -CD zu einer signifikanten Erhöhung der intraokularen Bioverfügbarkeit führt. Inwieweit die gemessenen Kammerwasserspiegel jedoch klinisch von Bedeutung sind, bleibt unklar. In der Literatur existieren weder Untersuchungen über Wirkspiegel im Auge nach topischer noch nach

systemischer Thalidomidapplikation.

Hinweise auf eine effektive Dosis bietet das Tiermodell der endotoxin-induzierten Uveitis bei dem 300-400 mg/Kg oral zu einer signifikanten antiinflammatorischen Wirkung führte, nicht aber 150 mg/Kg. Weiterhin war eine orale Thalidomiddosis von 50 mg 3 mal wöchentlich bei der Behandlung von oralen und genitalen Ulzerationen effektiv (23). Zusätzlich ist bekannt, daß eine tägliche Tabletteneinnahme von 800 mg racemischem Thaldiomid zu einer Serumkonzentration von maximal  $\sim 5\mu\text{g/ml}$  führt (78). Eine systematische Literaturlaufarbeitung von Erikson (28) über die orale Absorption von racemischem Thalidomid in Form von Kapseln oder Tabletten (meistens 100 mg), ergab beim Menschen (ca. 70kg), ein Zeitintervall von 2-4 Std. zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration ( $t_{\text{max}}$ ) und eine maximale Plasmakonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) von ca.  $1\mu\text{g/ml}$  (28).

Einer der Grundideen zur Formulierung von Thalidomidaugentropfen war die Vermeidung von okularen und systemischen Nebenwirkungen. Die 12,5 % HP- $\beta$ -CD-Thalidomid-Applikation führte im Rahmen der vorliegenden Studie zu keinen Reizzuständen am Kaninchenauge und hat sich damit als gut verträglich erwiesen. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Janson (60) zur Verträglichkeit einer Ein- und Mehrfachapplikation von 12,5% HP- $\beta$ -CD konnte keine toxischen Schädigungen an der Korneaoberfläche feststellen. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Freedmann (32) zur kornealen Toxizität bei der Applikation von 5% HP- $\beta$ -CD zeigte eine normale Korneaoberfläche ohne Verlust von Epithelzellen, Unterbrechung der Zellmembran oder Veränderung der Microvilli. Orientierende Blutentnahmen haben bei der THA-CD Formulierung nach 30 Minuten 1172,67 ng/ml und nach 60 Minuten 67,56 ng/ml ergeben. Bei der THA-SP Formulierung wurde ein Plasmagehalt von 804,65 ng/ml nach 30 Minuten und von 1154,13 ng/ml nach 60 Minuten bestimmt. Unser Ergebnis ca  $1\mu\text{g/ml}$  bei 1,0-1,5 kg schweren Kaninchen, im Vergleich zur maximalen Plasmakonzentration von ca  $1\mu\text{g/ml}$  bei einer oralen Dosis von 100mg bei ca. 70kg schweren Menschen deutet darauf hin, daß es bei der topischen Applikation zwar eine systemische Absorption auftritt, der erreichte Plasmaspiegel aber gering ist. Umfangreichere Untersuchungen wären notwendig, um das genaue Ausmaß an systemischer Absorption festzustellen.

Das pigmentierte Kaninchenauge kommt dem Menschenauge im Verhältnis zu anderen Tieraugen am ähnlichsten. Trotz dieser Ähnlichkeit können am Kaninchen durchgeführte Studien zum Effekt von Medikamententrägern auf die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Die Kontaktzeit ist für die Aufnahme von Wirkstoffen bei Penetrationsuntersuchungen sehr wichtig. Das menschliche Auge unterscheidet sich vom Kaninchenauge vor allem in der Anatomie und Physiologie. Das Kaninchen hat ein Tränenvolumen von  $7,5\mu\text{l}$  (Mensch  $7\mu\text{l}$ ), eine Austauschrate der Tränenflüssigkeit von  $0,53\mu\text{l/Minute}$  (7%/Min.) (Mensch  $1,2\mu\text{l/Minute}$  (16%/Min.)), blinzelt alle 15 Minuten (Mensch 12 mal/Minute), und hat eine Drainagerate von  $0,545/\text{Minute}$  (Mensch  $1,45/\text{Minute}$ ) (120). Die Austauschrate der Tränenflüssigkeit ist beim Kaninchen um ca. 50 % geringer. Dies führt zu einer Verlängerung der Kontaktzeit und damit zu einer erhöhten Absorptionsrate. Die besonderen Bedingungen am Kaninchenauge können dazu führen, daß eine Verlängerung der Verweildauer oder eine Viskositätsveränderung eines Medikamentes durch chemische Modifizierung beim Kaninchen zu keiner signifikanten Erhöhung der Bioverfügbarkeit führt, während dies aber beim Menschen zu einer signifikanten Erhöhung der Bioverfügbarkeit führen kann.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen dem menschlichen Auge und dem pigmentiertem Kaninchenauge ist die Aktion der Lider. Der Lidschlag ist ein entscheidender Faktor für die Durchmischung der Tränenflüssigkeit. Es ist also verständlich, daß eine geringere „Durchmischungsrate“ und dadurch auch eine geringere Abnahme an Fluoreszein-Konzentration zustande kommt, wenn der Lidschlag ausbleibt, oder so selten ist wie beim Kaninchen, das eine durchschnittliche Lidaktion von 4 mal pro Stunde besitzt (88). Diese reduzierte Lidaktion kann beim Kaninchen zu einer größeren Penetrationsrate führen, obwohl die Korneaepithelpenetration selbst, nachgewiesen durch Fluoreszein-Penetrationsversuche beim Menschen und Kaninchen (88), ein ähnliches Verhalten aufweist (96).

Wie schon beschrieben wird vermutet, daß Cyclodextrine durch eine „Depotwirkung“ ihre Löslichkeits- und stabilitätsverbessernden Eigenschaften entfalten. Eine erhöhte Blinzelfrequenz und dadurch erhöhte Freisetzung des Thalidomids aus dem Cyclodextrin-Komplex würde vermuten lassen, daß diese „Depotwirkung“ beim Menschen geringer ist.

Vor der klinischen Anwendung von Thalidomidaugentropfen stehen noch folgende Untersuchungen aus:

1. Ermittlung einer therapeutisch wirksamen Thalidomidkonzentration im Auge
2. Bestimmung des genauen Ausmaßes an systemischer Absorption
3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Kornea zur Feststellung von Langzeitschäden

Stellt sich heraus, daß die von uns ermittelte Thalidomidkonzentration therapeutisch ausreichend ist, es zu keiner Schädigung auch bei langfristiger Behandlung der Kornea kommt und die systemische Absorption nur gering ist, dann würde sich HP- $\beta$ -CD sehr gut zur Formulierung von wässrigen Thalidomidaugentropfen eignen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Thalidomid wurde am 1. Oktober 1957 als Sedativum von der Firma Chemie Grünenthal auf den deutschen Markt gebracht (21). 1961 unterstützten Hinweise den Verdacht, daß Thalidomid für bestimmte Mißbildung verantwortlich sein könnte, die häufigste hiervon war eine Deformität der Extremitäten. Die Teratogenität führte schließlich dazu, daß Thalidomid am 26. November 1961 in der Bundesrepublik Deutschland vom Markt genommen wurde. In den letzten Jahren erfuhr Thalidomid auf Grund seiner antiinflammatorischen, immunmodulatorischen und antiangiogenetischen Eigenschaften eine „Renaissance“. Krankheiten wie die Lepra lepromatosa, therapierefraktäre Dermatosen (41,66,117-118), Aphten bei Behçet-Krankheit (23,27,38,48-49,126,150-152,155), Ulzera bei AIDS-Patienten (3,57-59,105,154), HIV wasting (42-43,76-77,85,103,115), und das multiple Myelom (5,21,47,81,100,104,117,125,140) können mit Thalidomid behandelt werden. Bei ophthalmologischen Erkrankungen, die durch Gefäßproliferation gekennzeichnet sind, wie bei der diabetischen Retinopathie und der altersbedingten Makuladegeneration (33) oder bei immunpathologische Erkrankungen wie die Uveitis (44) liegen Berichte zu günstigen Effekten vor. Aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen bei der systemischen Verabreichung wurde für die Anwendung in der Augenheilkunde der Versuch einer topischen Applikation angestrebt. Dieser Applikationsweg ist limitiert durch die schlechte Wasserlöslichkeit (50 µg/ml) (78) und hydrolytischen Instabilität des Thalidomids bei der Formulierung von wässrigen Augentropfen zur Erreichung eines effektiven Wirkspiegels im Auge. Hierfür ist die Bioverfügbarkeit entscheidend, welche durch das Ausmaß sowie die Geschwindigkeit der Medikamentenaufnahme ins Kammerwasser bestimmt ist. Zur Erhöhung der intraokularen Bioverfügbarkeit von Thalidomid wurden Cyclodextrine, speziell HP-β-CD, als Vehikel zur Verbesserung der physiko-chemischen Eigenschaften verwendet. Die experimentelle Arbeit wurde an 21 Kaninchen durchgeführt, die mit Thalidomid-HP-β-CD haltigen Augentropfen oder mit einer Thalidomidsuspension behandelt wurden. Nach einer Einwirkungszeit von 30, 60, oder 240 Minuten wurden die Augen enukleiert, präpariert und eingefroren. Anschließend wurde mittels HPLC die jeweilige Thalidomid-Konzentration ermittelt. Unsere Arbeit hat signifikante Konzentrationsunterschiede im Kammerwasser zugunsten der HP-β-CD Formulierung und im Iris-Ziliarkörper zugunsten der Suspension gezeigt. Im Kammerwasser findet sich mit der THA-CD Zubereitung nach 30 Minuten 743,89 ng·ml<sup>-1</sup> (± 126,92 ng·ml<sup>-1</sup>) im Vergleich zu 156,39 ng·ml<sup>-1</sup> (± 32,20 ng·ml<sup>-1</sup>) bei der THA-SP Zubereitung. Im Iris-Ziliarkörper findet sich mit der THA-SP Zubereitung nach 60 Minuten 18,2 [µg·µg<sup>-1</sup>]<sub>10<sup>-6</sup></sub> im Vergleich zu 3,0 [µg·µg<sup>-1</sup>]<sub>10<sup>-6</sup></sub> bei der THA-CD Zubereitung. Die anderen Augengewebe: Konjunktiva, Kornea, Glaskörper, und Sklera haben keinen signifikanten Konzentrationsunterschied bei den verschiedenen Formulierungen gezeigt. Die Ergebnisse erlauben die Annahme, daß im Falle der THA-Suspension eine konjunktival-sklerale Aufnahme erfolgt. Bei dieser Aufnahme kommt es zu einer Umgehung der vorderen Augenkammer und dadurch zu einer geringeren Kammerwasserkonzentration sowie zu einer höheren Ziliarkörperkonzentration. Im Vergleich hierzu unterliegt die THA-CD Zubereitung eher einem kornealem Aufnahmeweg mit einer geringeren Konzentration im Ziliarkörper, einer höheren Konzentration im Kammerwasser und hiermit zu einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit. Unsere Studie hat gezeigt, daß 12,5% HP-β-CD sich zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Thalidomid eignet. Es ist zu überprüfen ob die intraokular erzielte Wirkstoffkonzentration auch biologisch wirksam ist. Bis heute ist die biologisch wirksame intraokulare Konzentration des Thalidomids nicht bekannt. Es bleibt künftigen Studien vorbehalten die offenen Fragen zur Dosis-Wirkungsfindung zu beantworten und klinisch geeignete Indikationen für eine Lokalthherapie mit Thalidomid herauszustellen.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Acheampong, A., Shackleton, M., Tang-Liu, D., et al., Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr. Eye Res.* 18(2):91-103 (1999).
2. Ahmed, I., Patton, T. F., Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 26:584-587 (1985).
3. Alexander, L. N. and Wilcox, C. M., A prospective trial of thalidomide for the treatment of HIV-associated idiopathic esophageal ulcers. *Aids Res. Hum. Retroviruses* 13:301-304 (1997).
4. American Academy of Ophthalmology – Basic and Clinical Science Course Section 2: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. 1994-1995:252.
5. Attal, M., Harousseau, J.-L., Stoppa A.-M., et al., A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 335:91-7 (1996).
6. Aumatell, A., Enantiomeric differentiation of a wide range of pharmacologically active substances by capillary electrophoresis using modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Chromatogr. A.* 686:293-307 (1994).
7. Baatz, H., Tönessen, B., Prada, J., Pleyer, U., Thalidomide Inhibits Leukocyte-Endothelium Interaction in Endotoxin-Induced Uveitis. *Ophthalmic Res.* 33:256-263 (2001).
8. Bartlett, J. D., Jaanus, S. D., Clinical Ocular Pharmacology. Butterworth Pub. Seite 7 (1989).
9. Battegay, E. J., Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* 73:333-346 (1995).
10. Baumann, M., Über das Ziliarfortsatzgefäßsystem. *Ber. Dtsch. Ophthal. Ges.* 48:364 (1930).
11. Bellamy, W. T., Richter, L., Frutiger, Y., Grogan, T. M., Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 59:728-33 (1999).
12. Bertelmann, E., Knapp, S., Rieck, P., et al., Transkornealer-parakornealer Penetrationsweg für lokal applizierte Pharmaka am Auge. Mycophenolat Mofetil als Modellsubstanz. *Ophthalmologie* 9:696-701 (2003).
13. Bloomfield, S. E., Miyata, T., Dunn, M. W., et al., Soluble gentamicin ophthalmic inserts as a drug delivery system. *Arch. Ophthal.* 96:885-887 (1978).
14. Choa, N., Nadermanee, A., O'Donnell, M. R., et al., Thalidomide for salvage therapy in chronic graft vs host disease. *Blood* 86(6):3604-3609 (1995).
15. Cogan, D., and Hirsch, E., The Cornea: VII. Permeability to weak electrolytes. *Arch. Ophthal.* 32:276 (1944).
16. Corral L. G., Haslett, P. A. J., Muller, G. W., et al., Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogs which are potent inhibitors of TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 163:380-6 (1999).
17. Corral, G. C., Kaplan, G., Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Annals of the rheumatic diseases* 88(suppl 1): 107-13 (1999).
18. Corral, L. G.; Muller, G. W., Moreira, A. L., et al., Selection of Novel Analogs of Thalidomide with Enhanced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibitory Activity. *Mol. Med.* 2(4): 506-515 (1996).
19. D'Amato, R. J., Lougham, M. S., Flynn, E., Folkman, J., Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4082-5 (1994).
20. Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazelhurst L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S., Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93:1658-67 (1999).
21. Dárcy, P. F., Griffin, J. P., Thalidomide revisited. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 13(2):65-77 (1994).

22. Davidson, S. K., Summers, J. B., Inhibitors of TNF- $\alpha$  synthesis. *Exp. Opin. Ther. Pats.* 5:1087-1100 (1995).
23. Denman, A. M., Graham, E. Howe, L., et al., Low dose thalidomide treatment of Behcet's syndrome. In: Wechsler B, Codeau P, eds. *Behcet's Disease. Proceedings of the 6th international Conference on Behcet's disease, 30 June-1 July 1993; Paris, France, Amsterdam. Excerpta Medica* 649-53 (1993).
24. Doane, M. G., Jensen, A. D., Dohlman, C. H., Penetration Routes of Topically Applied Eye Medications. *Am. J. of Ophthalm.* 85:383-386 (1978).
25. Edelhauser, H. F., Maren, T. H., Permeability of human cornea and sclera to sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors. *Arch. Ophthalm.* 106:1110-1115 (1988).
26. Ehlers, N., The precorneal film, biomicroscopical, histological and chemical investigations. *Acta Ophthalm. (Suppl.)(Copenh.)* 81(1965).
27. Ehrlich, G. E., Vasculitis in Behcet's disease. *Int. Rev. Immunol.* 14:81-8 (1997).
26. Eriksson, T., Björkman, S., Höglund, P., Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57:365-376 (2001).
29. Eriksson, T., Björkman, S., Roth, B., et. al., Stereospecific Determination, Chiral Inversion in Vitro and Pharmacokinetics in Humans of the Enantiomers of Thalidomide: Kinetics of the Enantiomers of Thalidomide. *Chirality* 7:44-52 (1995).
30. Eriksson, T., Björkman, S., Fyge, A., Ekberg, H., Determination of thalidomide in plasma and blood by high-performance liquid chromatography: avoiding hydrolytic degradation, *J. chromatography, J. Chromatogr.* 172:490-492 (1979)
31. Florence, A. L., Is Thalidomide to Blame? *Brit. Med. J. Dec.* 31, 1960:1954.
32. Freedmann, K. A., Klein, J. W., Crosson, C. E., Beta-Cyclodextrins enhance Bioavailability of Pilocarpine. *Curr. Eye Res.* 12:641-647 (1993).
33. Freeman, W. R., Blumenkranz, M. S., Age-related Macular Degeneration: Is Help on the Way?. *Ophthalm.* 105(9):1585-1586 (1998).
34. Friedberg, M., Pleyer, U., Mondino, B. J., Device Drug Delivery: Collagen Shields, Ionophoresis, Pumps. *Ophthalmology* 98: 725-732 (1991).
35. Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., et al., Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha integrins. *Science* 270:1500-1502 (1995).
36. Fullerton, P. M., O'Sullivan, D. J., Thalidomide neuropathy: a clinical, electrophysiological and histological follow-up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 31:543-551 (1968).
37. Gad, S. M., Shannon, E. J., Krotoski, W. A., et al., Thalidomide induces imbalances in T-lymphocyte subpopulations in the circulating blood of healthy males. *Lepr Rev.* 56:35-39 (1985).
38. Gardner-Medwin, J. M. M., Smith, N. J., Powell, R. J., Clinical experience with thalidomide in the management of severe oral and genital ulceration in conditions such as Behcet's disease: use of neurophysiological studies to detect thalidomide neuropathy. *Ann. Rheum. Dis.* 53:828-832 (1994).
39. Gori, A., Rossi, M. C., Marchetti, G., et al., Clinical and immunological benefit of adjuvant therapy with thalidomide in the treatment of tuberculosis disease. *AIDS* 14(12): 1859-1861 (2000).
40. Green, K., Kearse, C., Ocular penetration of topical  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol from rabbit corneal or cul-de-sac application site. *Cur. Eye Res.* 21(1): 566-570 (2000)
41. Grosshans, E., Illy, G., Thalidomide therapy for inflammatory dermatoses. *Int. J. Dermatol.* 23:598-602 (1984).
42. Grunfeld, C., Feingold, K. R., Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 327:329-337 (1992).

43. Guenter, P., Murahainen, N., Simons, G., et al., Relationship among nutritional status, disease progression and survival in HIV infection. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6: 1130-1138 (1993).
44. Guex-Crosier, Y., Pittet, N., Herbort, C. P., The effect of thalidomide and suplidimide on endotoxin-induced uveitis in rats. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 233:90-93 (1995).
45. Günzler, V., Thalidomid – A Therapy for the Immunological Consequences of HIV Infection. *Med. Hypotheses* 30:105-109 (1989).
46. Gutierrez-Rodriguez, O., Starusta-Bacal, P., Gutierrez-Montes, O., Thalidomide-induced neuropathy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31: 145-146 (1988).
47. Hallek, M., Leif Bergsagel, P., Anderson, K. C., Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91: 3-21 (1998).
48. Hamuryudan, V., Mat, C., Saip, S., et al., Thalidomide in the Treatment of the Mucocutaneous Lesions of the Behcet Syndrome. *Ann. Int. Med.* 128(6):443-450 (1998).
49. Hamuryudan, V., Özdoğan, H., Yazici, H., Other forms of vasculitis and pseudovasculitis. *Ballières Clin Rheumatol.* 11:335-55 (1997).
50. Haslett, P. A., Corral, L. G., Albert, M., et al., Thalidomide costimulates primary human T-lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J. Exp. Med.* 187:1885-1892 (1998).
51. Haslett, P., Tramontana, J., Burroughs, M., et al., Adverse reactions to thalidomide in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 24:1223-1227 (1997).
52. Heney, D., Norfolk, D. R., Wheeldon, J., et al., Thalidomide treatment for chronic graft versus host disease. *Br. J. Haematol.* 78:23-27 (1991).
53. Hess, C. W., Hunziker, T., Kupfer, A. Ludin, H. P., Thalidomide-induced peripheral neuropathy. A prospective clinical, neurophysiological and pharmacogenetic evaluation. *J. Neurol.* 223:83-9 (1986).
54. Hollwich, F., Einführung in die Augenheilkunde. 6. überarbeitete Aufl. G. Thieme Verlag Stuttgart, Seite 9 (1968).
55. Hollwich, F., Einführung in die Augenheilkunde. 6. überarbeitete Aufl. G. Thieme Verlag Stuttgart, Seite 3 (1968).
56. Holm, O., and Krakau, C., Measurement of the flow of aqueous humor according to a new principle. *Experientia* 22: 773 (1966).
57. Hussein, M. A., Research on Thalidomide in Solid Tumors, Hematologic Malignancies, and Supportive Care. *Oncology.* 14(Suppl 12):9-15 (2000).
58. Jacobson, J. M., Greenspan, J. S., Spritzler, J., et al, Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N. Eng. J. Med.* 336(21): 1487-1493 (1997).
59. Jacobson, J. M., Spritzler, J., Fox, L., et al., and the National Institute of Allergy and Infectious Disease AIDS Clinical Trials Group, Thalidomide for the treatment of esophageal aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 180:61-67 (1999).
60. Jansen, T., Beta-Cyclodextrins as vehicles in eye-drop formulations: An evaluation of their effects on rabbit corneal epithelium. *Lens Eye Toxicity Res.* 7: 459-468 (1990).
61. Järvinen, K., The effect of a modified  $\beta$ -cyclodextrin, SBE4- $\beta$ -CD, on the aqueous stability and ocular absorption of pilocarpine. *Curr. Eye Res.* 13:897-905 (1994).
62. Jorizzo, J. L., Schmalstieg, F. C., Solomon, A. R. Jr, et al., Thalidomide effects in Behcet's syndrome and pustular vasculitis. *Arch. Intern. Med.* 146:878-81 (1986).



63. Jousseaume, A. M., Germann, T., Kirchhof, B. Effect of thalidomide and structurally related compounds on corneal angiogenesis is comparable to their teratological potency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 237:952-961 (1999).
64. Kaiser, R. J., and Maurice, D. M., The diffusion of fluorescein in the lens. *Exp. Eye Res.* 3:156 (1964).
65. Kanai, A., The Effect on the Cornea of Alpha Cyclodextrin Vehicle for Cyclosporin Eye Drops. *Transplan. Proc.* 21(1):3150-3152 (1989).
66. Kaplan, G., Cytokine Regulation of Disease Progression in Leprosy and Tuberculosis. *Immunobiol.* 191:564-568 (1994).
67. Keipert, S., Interactions between cyclodextrins and pilocarpine – as an example of hydrophilic drug. *Int. J. Pharm.* 142:153-162 (1996).
68. Klausner, J. D., Freedman, V. H., Kaplan, G., Thalidomide as an anti-TNF- $\alpha$  inhibitor: Implications for clinical use. *Clin Exp Immunol.* 81:219-223 (1996).
69. Klausner, J., Freedman, V. H., and Kaplan, G., A short Analytical Review Thalidomid as an Anti-TNF- $\alpha$  Inhibitor: Implications for Clinical Use. *Clin. Immunol. & Immunopathol.* 81(3): 219-223 (1996).
70. Klein, M., Beitrag zur Resorption aus Augensalbe: II. Die Resorption des Atropins. *Albrecht Von Graefes Arch. Ophthalmol.* 129:413 (1933).
71. Klyce, S. D., Transport of Na, Cl, and water by the rabbit corneal epithelium at resting potential. *Am. J. Physiol.* 228:1446 (1975).
72. Knop, J., Bonsmann, G., Happle, R., Ludolph, A., et al., Thalidomide in the treatment of sixty cases of chronic discoid lupus erythematosus. *Br. J. Dermatol.* 108:461-466 (1983).
73. Koch, Heinrich P., Löslichkeits- und Stabilitätsverbesserung von Thalidomid durch Bildung von Einschlusskomplexen mit Cyclodextrinen. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 321:371-373 (1988).
74. Koevary, S.B., Pharmacokinetics of Topical Ocular Drug Delivery: Potential Uses for the Treatment of Diseases of the Posterior Segment and Beyond. *Curr. Drug Met.* 4:213-222 (2003)
75. Kogiso, M., Tanouchi, Y., Mimura, Y., Nagasawa, H., Himeno, K., Endotoxin-induced uveitis in mice I. Induction of uveitis and role of T-lymphocytes. *Jpn. J. Ophthalmol.* 36:281-290 (1992).
76. Kotler, D. P., Tierney, A. R., Wang, J., Pierson, R. N., Magnitude of body cell-mass depletion and the timing of death from wasting in AIDS. *Am. J. Clin. Nutr. MWR.* 50:444-447 (1989).
77. Kotler, D. P., Wang, J., Pierson, R. N., Body composition studies in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 42:1255-1265 (1985).
78. Krenn, M., Gamcsik, M. P., Vogelsang, G. B., et. al., Improvements in Solubility and Stability of Thalidomide upon Complexation with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *J. of Pharm. Sciences* 81(7): 685-689 (1992).
79. Kruse, F. E., Jousseaume, A. M., Rohrschneider, K., et. al., Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 236:461-466 (1998).
80. Lagueny, A., Rommel, A., Vignolly, B., et al., Thalidomide Neuropathy: An Electrophysiologic Study. *Muscle & Nerve* 9: 837-844 (1986).
81. Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P. A., Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 49:12 (1999).
82. Lee, V. H., Robinson, J. R., Review: topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. *J. Ocul. Pharmacol.* 2: 67-108 (1986).
83. Loftsson, T., 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in topical carbonic anhydrase inhibitor formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1:175-180 (1994).
84. Loftsson, T., Stefánsson, E., Cyclodextrins in eye drop formulations: enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye. *ACTA Ophthalmol. Scandin.* 80: 144-150 (2002)

- 85.Marriott, J. B., Muller, G., Dalglish, G., Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immun. Today* 20:538-40 (1999).
- 86.Maurice, D. M., Ocular pharmacokinetics. In: Sears ML, ed *Pharmacology of the Eye*. New York: Springer-Verlag 19-116 (1984).
- 87.Maurice, D. M., The dynamics and drainage of tears. *Int. Ophthalmol. Clin.* 13(1):103 (1973).
- 88.Maurice, D., Structures and fluids involved in the penetration of topically applied drugs. *Inter. Ophthal. Clinics* 20(3):7-20 (1980).
- 89.McCarty, M. F., Thalidomide may impede cell migration in primates by down-regulating integrin  $\beta$ -chains: Potential therapeutic utility in solid malignancies, proliferative retinopathy, inflammatory disorders, neointimal hyperplasia, and osteoporosis. *Medical Hypotheses* 49:123-131 (1997).
- 90.McHugh, S. M., Rifkin, I. R., Deighton, J., et al., The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin. Exp. Immunol.* 99:160-167 (1995).
- 91.Mishima, S., Some physiological aspects of the precorneal tear film. *Arch. Ophthalmol.* 73:233 (1965).
- 92.Moriera, A. L., Sampaio, E. P., Zmuidzinis, A., et al., Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor- $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.* 177:1675-1680 (1993).
- 93.Muller, G. C., Chen, R., Huang, S-Y, et al., Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- $\alpha$  production. *Bioorg. Med. chem. Lett.* 9:1625-30 (1999).
- 94.Ochonisky, S., Verroust, J., Bastiju-Garin, S., et al., Thalidomide neuropathy: incidence and electrophysiologic findings in 42 patients. *Arch. Dermatol.* 130:66-69 (1994).
- 95.Olsen, T. W., Edelhauser, H. F., Lim, J. I., et al., Human scleral permeability. Effects of age, cryotherapy, transscleral diode laser, and surgical thinning. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 36:1895-1903 (1995).
- 96.Ota, Y., Mishima, S., and Maurice, D., Endothelial permeability of the living cornea to fluorescein. *Invest. Ophthalmol.* 13:945 (1974).
- 97.Parman, T. Wiley, M. J., Wells, P. G., Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat. med.* 5:582-5 (1999).
- 98.Pleyer, U., Grammer, J., Bachmann, W., Thiel, H.-J., Kollagenlinsen: Anwendungen und therapeutische Möglichkeiten. *Akt. Augenheilk.* 20:173-183 (1995).
- 99.Pleyer, U., Liekfeld, A., Baatz, H., Hartmann C., Pharmakologische Modulation immunmediierter Erkrankungen des Auges, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 214: 160-170 (1999).
- 100.Raje, N., Anderson, K., Thalidomide – A Revival Story. *N. Engl. J. Med.* 341:1606-1609 (1999).
- 101.Rajewski, R. A., Valentino, S. J., Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* 85.11: 1142-1169 (1996).
- 102.Rajkumar, S. V., Thalidomide in Hematologic and Oncologic Disease. *Oncology* 14 (Suppl.13):9-10 (2000).
- 103.Reyes-Teràn, G., Sierra-Madero, J. G., Martínez del Cerro, V., et. al., Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *AIDS* 10:1501-1507 (1996).
- 104.Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., et al., Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Br. J. Cancer* 79:451-5 (1999).
- 105.Ryan, J., Coleman, J., Pedersen, J., Benson, E., Thalidomide to treat oesophageal ulcers in AIDS. *N. Engl. J. Med.* 327:208-209 (1992).

- 106.Sampaio, E. P., Sarno, E. N., Galilly, R., et al., Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 173:699-703 (1991).
- 107.Saari, M. K., Ali-Meikkilä, T., Vuori, M.L., et al., Absorption of ocular timolol: drug concentrations and  $\beta$ -receptor binding activity in the aqueous humour of the treated and contralateral eye. *ACTA Ophthalm.* 71:671-676 (1993)
- 108.Sylan, T. Saltik, I., Thalidomide in the treatment of Behcet's syndrome. *Arch.Dermatol.* 118:536 (1982).
- 109.Schlossberg, H., Klumpp, T., Sabol, P., et al., Severe cutaneous ulceration following treatment with thalidomide for GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 27(2):229-30 (Jan. 2001).
- 110.Schoenwald, R. D., Deshpande, G. S., Rethwisch, D. G., et al., Penetration into the anterior chamber via the conjunctival/scleral pathway. *J. Ocular Pharm. Therap.* 13:41-59 (1997).
- 111.Schoenwald, R. D., Pharmacokinetics in Ocular Drug Delivery. In: Edman P. Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery. Ann Arbor MI: CRC Press; Chap 10 (1992).
- 112.Schoenwald, R. D., Ocular drug delivery pharmacokinetic considerations. *Clin. Pharmacokinet.* 19:225-269 (1994).
- 113.Schoenwald, R. D., Ocular Pharmacokinetics. Textbook of Ocular Pharmacology, ed. Zimmerman, et al. Lippencott-Raven Publishers, Philadelphia 119-150 (1997).
- 114.Schumacher, H., Smith, R. L., Williams, R. T., The Metabolism of Thalidomide: The Spontaneous Hydrolysis of Thalidomide in Solution. *Brit. J. Pharmacol.* 25: 324-337 (1994).
- 115.Sharpstone, D., Rowbottom, A., Nelson, M., et al., Faecal tumour necrosis factor-alpha in individuals with HIV-related diarrhoea. *AIDS (United States)* 10(9):989-94 (1996).
- 116.Shek, L. P., Lee, Y. S., Lee, B. W., Thalidomide Responsiveness in an Infant with Behcet's Syndrome. *Pediatrics* 103:1295-1297 (1999).
- 117.Sherkin, J., Study with nine thalidomide derivatives in the lepra reaction. *Dermatol.* 17:82 (1978).
- 118.Sherkin, J., The Treatment of Lepa Reaction in Lepromatous Leprosy: Fifteen Years' Experience with Thalidomide. *Int. J. Dermatol.* 19:318-22 (1980).
- 119.Shigetoshi, N., Saiichi, M., Pharmacokinetics of Instilled Drugs in the Human Eye. *Intern. Ophthalm. Clin.* 20(3):33-49 (1980).
- 120.Siefert, B., Keipert, S., Influence of alpha-cyclodextrin and hydroxyalkylated beta-cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCL solutions, *J. Pharm. Sci.* 86(6):716-720 (1997)
- 121.Siefert, B., Siefert, B., Pleyer, U., Müller, M., Hartmann, C., Keipert, S., Influence of cyclodextrins on the in vitro corneal permeability and in vivo distribution of thalidomide. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* (USA). 15(5):429-438 (Oct 1999)
- 122.Sieg, J., and Robinson, J., Mechanistic studies on transcorneal permeation of pilocarpine. *J. Pharm. Sci.* 65:1816 (1976).
- 123.Silva, A. T., Bayston, K. F., Cohen, J., Prophylactic and therapeutic effects of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$  in experimental gram-negative shock. *J. Infect. Dis.* 162:421-427 (1990).
- 124.Simpson, J. A., Thalidomide Neuropathy. *Brit. Med. J.* Dec. 14, 1963:1527.
- 125.Singhal, S, Mehta, J., Desikan, R, et al., Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341:1565-71 (1999).
- 126.Soylan, T. Saltik, I., Thalidomide in the treatment of Behcet's syndrom. *Arch. Dermatol.* 118:536 (1982).

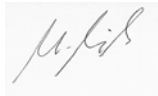
127. Stella, V. J., Rajewski, R. A., Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery. *Pharm. Res.* 14(5): 556-567 (1997).
128. Stephens, T. D., Bunde, C. J. W., Fillmore, B. J., Mechanism of Action in Thalidomide Teratogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 59:1489-1499 (2000).
129. Stietter, R. M., Kunkel, S. J., Bone, R. C., Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in disease states and inflammation. *Crit. Care Med.* 21:447-463 (1993).
130. Szejtli, J., Medicinal applications of cyclodextrins. *Med. Res. Rev.* 14:353-386 (1994).
131. Tabin, C. J., A developmental model for thalidomide defects. *Nature* 396:322-323 (1998).
132. Tan, A. Y., LeVatte, T.L., Archibald, M.L., et al. Timolol Concentrations in Rat Ocular Tissues and Plasma After Topical and Intraperitoneal Dosing. *J. Glaucoma.* 11:134-142 (2002).
133. Tetsumi, I., Kaneto, U., Pharmaceutical applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J. Pharm. Sci.* 862:147-162 (1997).
134. Thalidomid capsules (thalidomide) prescription product insert. Celgene, Warren, NJ, revised August 1998.
135. Thiel, R., Atlas der Augenheilkunde. 6. Aufl. G. Thieme Verlag, Stuttgart, Seite 64 (1963).
136. Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., et al., Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330:662-664 (1987).
137. Trolle-Lassen, C., Investigations into the sensitivity of the human eye to hypo- and hypertonic solutions as well as solutions with unphysiological hydrogen ion concentrations. *Pharm. Weekbl.* 93:148-155 (1958).
138. Tseng, S., Pak, G., Washenik, K., et al. Rediscovering thalidomide: A review of its mechanisms of action, side effects, and potential uses. *J. Am. Acad. Dermatol.* 35:969-979 (1996).
139. Usayapant, A., Karara, A. H., Narurkar, M. M., Effect of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the ocular absorption of dexamethasone and dexamethasone acetate. *Pharm. Res.* 8 (12):1495-1499 (1991).
140. Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M., et al., Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 93:3064-73 (1999).
141. Valentino, S. J., Rajewski, R. A., Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery. *Pharm. Res.* 145: 556-567 (1997).
142. Van Doorne, H., Interactions between Cyclodextrins and Ophthalmic Drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39(4):133-139 (1993).
143. Vedat, H., Cem, M., Sebahattin, S., et al., Thalidomide in the Treatment of the Mucocutaneous Lesions of the Behcet Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann. Internal Med.* 128(6):443-450 (March 1998).
144. Viraben, R., Dupre, A., Erythema nodosum following thalidomide therapy for Behcet's disease. *Dermatologica.* 176:107 (1988)
145. Voigt, M., Kralinger, M., Kieselbach, G., Ocular Asprin Distribution: A comparison of Intravenous, Topical and Coulomb-Controlled Iontophoresis Administration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:3299-3306 (2002).
146. Walchner, M., Meurer, M., Plewig, G., et al., Clinical and immunologic parameters during thalidomide treatment of lupus erythematosus. *Int. J. Derm.* 29:383-388 (2000).
147. Weng, W., Sasaki, H., Chien, D. S., et al., Lipophilicity influence on conjunctival drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration. *Curr. Eye Res.* 10:571-579 (1991).

148. Whitcup, S., Pleyer, U., Lai, J., Lutz, S., Mochizuki, M., Chan, C., Topical liposome-encapsulated FK506 for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Ocul. Immunol. & Inflamm.* 6(1):51-56 (1998).
149. Wolkenstein, P., Lатарjet, J., Roujeau J. C., et al., Randomised comparison of thalidomide versus placebo in toxic epidermal necrolysis. *Lancet* 352:156-1589 (1998).
150. Yazici, H., Chamberlain, M. A., Tüürn, Y, et al., A comparative study of the pathergy reaction among turkish and British patients with Behcet's disease. *Ann. Rheum. Dis.* 43:74-5 (1984).
151. Yazici, H., Pazarli, H., Barnes, C. G., et al., A controlled trial of azathioprine in Behcet's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 322:281-5 (1990).
152. Yazici, H., Yurdakul, S. Hamuryudan, V., Behcet's syndrome. How should we treat it?. *Clin. Immunother.* 3:102-7 (1995).
153. Youle, M., Clabour, J., Farthing, C., et al., Treatment of resistant aphthous ulceration with thalidomide in patients positive for HIV antibody. *BMJ.* 298:432 (1989).
154. Youle, M., Clabour, J. Furthing, C., Connolly, M., et al., Treatment of resistant aphthous ulceration with thalidomide in patients positive for HIV antibody. *BMJ.* 298:432 (1989).
155. Yurdakul, S., Tüzüner, N., Yurdakul, I., et al., Gastrointestinal involvement in Behcet's syndrome: a controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 55:208-10 (1996).
156. Zwingenberger, K., Wendt, S., Immunomodulation by thalidomide: systemic review of the literature and of unpublished observations. *J. Inflamm.* 46:177-211 (1996).

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorgelegte Dissertation von mir selbst verfasst wurde und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt wurden.

Weiterhin erkläre ich, daß ich noch kein Promotionsverfahren an anderer Stelle beantragt habe.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Müller', is shown within a light gray rectangular box.

Martina Müller

28. Januar 2005